

Université de Montréal

Études des mécanismes régulateurs des canaux Cl^- activés par le
calcium des myocytes vasculaires

par
Jonathan Ledoux

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en Physiologie

Mars, 2004

© Jonathan Ledoux, 2004



W
4
U58
2004
v.061

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Études des mécanismes régulateurs des canaux Cl^- activés par le calcium des
myocytes vasculaires

présentée par :
Jonathan Ledoux

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent
président rapporteur

Normand Leblanc
directeur de recherche

Rémy Sauvé
Codirecteur

Terence Hebert
membre du jury

Mohamed Chahine
examineur externe



Abrégé

Les canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} (Cl_{Ca}) jouent un rôle prépondérant dans le contrôle du potentiel membranaire des myocytes et donc du tonus vasculaire en réponse à divers agents vasoconstricteurs tels que les hormones et les neurotransmetteurs. La dialyse d'une solution contenant une concentration interne en Ca^{2+} fixe et connue a permis la caractérisation d'un courant Cl^- activé par le Ca^{2+} , $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, dans les myocytes de la veine porte ainsi que dans les artères coronaire et pulmonaire de lapin. L'expression fonctionnelle de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ s'est avérée être nettement plus faible dans la veine porte que dans les myocytes artériels. Les mesures de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ effectuées dans des myocytes coronaires ont permis d'établir que la valeur de E_{Ca50} dans ce cas correspond à $363 \pm 20 \text{ nM}$ à $+50 \text{ mV}$.

Une des approches expérimentales utilisées pour l'étude des rôles physiologiques des canaux Cl_{Ca} consiste à inhiber le canal avec des agents pharmacologiques sélectifs. Or, des travaux ont déjà démontré que l'acide niflumique (ANF), le plus puissant inhibiteur de Cl_{Ca} , pouvait stimuler $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ dans des myocytes pulmonaires. La dynamique de ce phénomène fut donc évaluée dans les myocytes coronaires. Nos résultats montrent que le retrait de l'ANF du milieu externe stimule $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ indépendamment de la concentration ($\geq 10 \mu\text{M}$). Par contre, les cinétiques de la stimulation se sont avérées variables en fonction de la concentration d'ANF et du voltage. L'ensemble de ces résultats expérimentaux a pu être modélisé en modèle cinétique incluant deux sites de liaison.

Peu d'études ont jusqu'à présent démontré des mécanismes de régulation de l'activité des Cl_{Ca} . Des travaux récents suggèrent toutefois que $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ est modulé par

la kinase dépendante de la calmoduline (CaMKII). Nos résultats montrent que l'inhibition de CaMKII par le KN-93 et un peptide inhibiteur (ARIP) augmente $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels, alors que l'inclusion de l'enzyme constitutivement active réduit le courant. Ceci suggère qu'une phosphorylation par CaMKII pourrait inhiber les canaux Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses artérielles. La présence de KN-93 ou d'ARIP n'a cependant pas augmenté $I_{Cl(Ca)}$ dans les myocytes de la veine porte.

La phosphorylation inhibitrice par CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ nécessite au moins une phosphatase pour en renverser l'action. Nos résultats indiquent à cet égard que l'inhibition de la calcineurine (CaN), une phosphatase Ca^{2+} -dépendante, par la cyclosporine A (CsA) de même que par un peptide inhibiteur (CaN-AF), diminue le courant des cellules musculaires lisses coronaires en présence de $[Ca^{2+}]_i \leq 500$ nM. En fait, la déphosphorylation par la CaN déplace la courbe d'activation du canal par le Ca^{2+} de 149 nM. Cet effet fut également observé au niveau de l'artère pulmonaire. L'inclusion de CaNA α constitutivement active dans le milieu intracellulaire a pu stimuler $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'artère pulmonaire, alors que la présence de CaN-AF ou la dialyse soit de l'enzyme bouillie ou soit de l'isoforme β , s'est avérée sans effet sur le courant.

En conclusion, $I_{Cl(Ca)}$ apparaît finement contrôlé par des processus de phosphorylation impliquant des enzymes activées par le Ca^{2+} en plus d'une activation directe du canal par le Ca^{2+} .

Mots-clés : Cl_{Ca} - Muscle lisse vasculaire – CaMKII – Calcineurine – Acide niflumique

Abstract

Ca^{2+} -activated Cl^- channels (Cl_{Ca}) play a prominent role in the regulation of vascular tone in response to vasoactive hormones and neurotransmitters via an effect on the membrane potential. Cell dialysis with a solution containing a known free $[\text{Ca}^{2+}]_i$ enabled a characterization of Cl_{Ca} in freshly dispersed rabbit portal vein and pulmonary and coronary arterial smooth muscle cells. The functional expression of Cl_{Ca} currents ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) was much stronger in arterial than venous myocytes, regardless of the method used to elicit the current. From our results in coronary myocytes, the E_{Ca50} was evaluated at 363 ± 20 nM at +50 mV.

One approach commonly used to investigate the physiological roles of these channels consists in the use of selective pharmacological probes. Previous studies have shown that niflumic acid (NFA), considered to be the most potent inhibitor of Cl_{Ca} , could stimulate $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ in pulmonary myocytes. We therefore sought to study the dynamics of such phenomenon in coronary myocytes. Removal of NFA from the external solution enhanced $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ independently of drug concentration (≥ 10 μM) used. Stimulation kinetics appeared however slower as the NFA concentration or voltage was increased. A kinetic model with two binding sites was constructed and computer simulations were found to be in accordance with our experimental data.

The critical function for Cl_{Ca} in vascular tone implies that the activity of these channels is finely tuned. Recent evidence suggests that Cl_{Ca} currents ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) are modulated through phosphorylation by Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII). Whilst inhibition of CaMKII by KN-93 and a specific inhibitory peptide

(ARIP) significantly enhanced $I_{Cl(Ca)}$ in arterial myocytes, inclusion of autonomously active CaMKII in the cytosol reduced the current. From these data, we concluded that phosphorylation by CaMKII inhibits Cl_{Ca} channels of arterial smooth muscle cells. In contrast, presence of KN-93 and ARIP, two selective inhibitors of CaMKII, had little, if any, effect on $I_{Cl(Ca)}$ in portal vein myocytes.

The inhibition of $I_{Cl(Ca)}$ in arterial smooth muscle cells by a CaMKII-dependent process suggests that the channels must also be regulated by at least one phosphatase. We found that the inhibition of calcineurin (CaN), a Ca^{2+} -dependent phosphatase, by cyclosporin A (CsA) or by a specific inhibitory peptide (CaN-AF), decrease the current in coronary smooth muscle cells in the presence of $[Ca^{2+}]_i \leq 500$ nM. In fact, dephosphorylation by CaN was shown to sensitize the channel to intracellular Ca^{2+} by 149 nM. The same effect was recorded in the pulmonary artery. Inclusion of a constitutively active form of a CaNA isoform, CaNA α , in the cytoplasm was found in turn to stimulate $I_{Cl(Ca)}$ of pulmonary myocytes while the inclusion of CaN-AF, boiled CaNA α or of CaNA β produced little, if any, effect on the current.

In conclusion, $I_{Cl(Ca)}$ is finely tuned by phosphorylation and dephosphorylation involving Ca^{2+} -dependent enzymes concomitant with a direct activation of the channel by Ca^{2+} .

Keywords: Cl_{Ca} – vascular smooth muscle – CaMKII – Calcineurin – Niflumic acid

Section D	Calcineurine	77
D.1	Structure de la calcineurine	77
D.2	Mécanismes d'activation	79
D.3	Pharmacologie	82
D.4	Rôles physiologiques	84
Section E	Justification et objectifs	87

CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES 93

<i>Isolation cellulaire</i>	94
<i>Électrophysiologie</i>	95
<i>Solutions et composés chimiques</i>	97
<i>Immunofluorescence et immunocytochimie</i>	100
<i>Immunobuvardage</i>	103
<i>Simulations informatiques</i>	103
<i>Analyses statistiques</i>	104

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS 105

<i>Section 3.A :</i>	<i>Caractérisation du courant anionique des myocytes vasculaires</i>	106
<i>Section 3.B :</i>	<i>Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin</i>	120
<i>Section 3.C :</i>	<i>Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII</i>	142
<i>Section 3.D :</i>	<i>Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels de lapin par la CaN</i>	161

CHAPITRE 4 : DISCUSSION **180**

<i>Section 4.A :</i>	<i>Caractérisation du courant anionique des myocytes vasculaires</i>	181
<i>Section 4.B :</i>	<i>Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin</i>	187
<i>Section 4.C :</i>	<i>Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII</i>	197
<i>Section 4.D :</i>	<i>Stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels de lapin par la calcineurine</i>	204

CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS **215**

<i>Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$</i>	216
<i>Régulation par phosphorylation de $I_{Cl(Ca)}$ dans le muscle lisse vasculaire</i>	217

SOURCES DOCUMENTAIRES **219**

APPENDICES **xxii**

<i>Appendice I :</i>	<i>Solutions</i>	xxiii
<i>Appendice II :</i>	<i>Paramètres utilisés pour simuler par ordinateur le modèle cinétique décrivant l'inhibition et la stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ par l'acide niflumique</i>	xxiv

Liste des tableaux

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Tableau 1.A.5-1	<i>Nomenclature des CLCA</i>	32
Tableau 1.A.5-2	<i>Localisation tissulaire des CLCA</i>	38
Tableau 1.A.5-3	<i>Inhibiteurs des CLCA</i>	39

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Tableau 3.A.1	<i>Caractérisation du courant enregistré dans la veine porte et les artères coronaire et pulmonaire de lapin</i>	111
----------------------	--	-----

Liste des figures

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Figure 1.1	<i>Courbe d'autorégulation</i>	5
Figure 1.2	<i>Mécanismes d'augmentation du calcium cytoplasmique des cellules musculaires lisses</i>	6
Figure 1.3	<i>Couplage excitation-contraction dans le muscle lisse vasculaire</i>	7
Figure 1.4	<i>« Courant de fenêtre » calcique en régime établi via $Ca_{(L)}$ des CML d'artères coronaires de lapin</i>	11
Figure 1.A.4-1	<i>Structure des ClC</i>	25
Figure 1.A.4-2	<i>La famille des ClC</i>	28
Figure 1.B.1-1	<i>Tracé représentatif de Cl_{vol}</i>	45
Figure 1.B.2-1	<i>Illustration des approches expérimentales utilisées pour étudier Cl_{Ca}</i>	49
Figure 1.B.2-2	<i>Structure de l'ANF</i>	62
Figure 1.C.1-1	<i>Structure de CaMKII</i>	70
Figure 1.D.1-1	<i>Structure de la calcineurine</i>	78
Figure 1.D.2-1	<i>Activation de la calcineurine</i>	80

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

Figure 3.A.1	<i>Caractérisation du courant anionique des cellules musculaires lisses artérielles et veineuses de lapin dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$</i>	107
Figure 3.A.2	<i>Comparaison de l'expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ chez les myocytes d'AP, d'AC et de VP de lapin</i>	110

Figure 3.A.3	<i>Voltage- et Ca^{2+}-dépendance du courant anionique des myocytes artériels pulmonaires et coronaires</i>	113
Figure 3.A.4	<i>Comparaison de l'amplitude de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ des myocytes d'AP et d'AC dialysés avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$</i>	115
Figure 3.A.5	<i>Courants $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de myocytes d'AC dialysés avec une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre variant entre 0 et 1 μM</i>	117
Figure 3.A.6	<i>Relation entre $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ et la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ du myocyte d'AC</i>	118
Figure 3.B.1	<i>Stimulation du courant Cl^- activé par le Ca^{2+} par l'acide niflumique des myocytes coronaires de lapin dialysés avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre</i>	121
Figure 3.B.2	<i>Effets du retrait de l'ANF sur les cinétiques d'activation et de désactivation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$</i>	123
Figure 3.B.3	<i>Dynamiques du courant stimulé suivant le retrait de l'ANF en fonction de la concentration utilisée</i>	125
Figure 3.B.4	<i>Courbe dose-réponse de l'inhibition de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par l'ANF</i>	126
Figure 3.B.5	<i>Corrélation entre la concentration d'ANF et les dynamiques de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$-stimulé par le retrait de l'inhibiteur</i>	128
Figure 3.B.6	<i>Potentiel membranaire et dynamiques de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$-stimulé par le retrait de l'ANF</i>	129
Figure 3.B.7	<i>Influence du potentiel membranaire sur l'inhibition de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par l'ANF</i>	130
Figure 3.B.8	<i>Quantification de la dépendance au potentiel de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$-stimulé induit par le retrait de 100 μM ANF</i>	132
Figure 3.B.9	<i>Propriétés de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$-stimulé</i>	133
Figure 3.B.10	<i>Différents modèles cinétiques évalués par simulation informatique</i>	135
Figure 3.B.11	<i>Simulation des effets de l'ANF sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par modélisation informatique</i>	138

Figure 3.B.12	<i>Comparaison entre les données expérimentales et le modèle à trois états ouverts de la figure 3.B.10-G</i>	140
Figure 3.C.1	<i>Effets du remplacement de l'ATP par son analogue non-hydrolysable, l'AMP-PNP sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes pulmonaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre</i>	143
Figure 3.C.2	<i>Effets d'un inhibiteur de CaMKII, le KN-93, sur les courants induits par une dépolarisation enregistrés en configuration de patch perforé</i>	145
Figure 3.C.3	<i>Inhibition réversible par le KN-93 de $I_{Cl(Ca)}$ induit par 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes de VP</i>	147
Figure 3.C.4	<i>Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre</i>	148
Figure 3.C.5	<i>Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AC dialysés avec 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ libre</i>	150
Figure 3.C.6	<i>Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AC à température quasi-physiologique</i>	151
Figure 3.C.7	<i>Effets du KN-93 sur la courbe d'activation en régime établi de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP</i>	153
Figure 3.C.8	<i>Effets d'un peptide inhibiteur de CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ d'AP dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$</i>	155
Figure 3.C.9	<i>Effets de la dialyse de myocytes d'AP avec une forme constitutivement active de CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ d'AP en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$</i>	157
Figure 3.C.10	<i>Immunodétection de CaMKII et CaN de myocytes coronaires</i>	159
Figure 3.D.1	<i>Effets de la cyclosporine A, un inhibiteur de CaN, sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes coronaires dialysés avec 350 nM $[Ca^{2+}]_i$</i>	162
Figure 3.D.2	<i>Effets de la cyclosporine A sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes coronaires dialysés avec 500 nM ou 1 μM $[Ca^{2+}]_i$</i>	164
Figure 3.D.3	<i>Effets de la cyclosporine A sur la dépendance au potentiel membranaire et au Ca^{2+} de $I_{Cl(Ca)}$</i>	165

Figure 3.D.4	<i>Effets de la cyclosporine A sur les cinétiques d'activation et de désactivation de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes dialysés avec 500 nM et 1 μM $[Ca^{2+}]_i$</i>	167
Figure 3.D.5	<i>Effets d'un peptide inhibiteur hautement sélectif pour la CaN sur $I_{Cl(Ca)}$</i>	169
Figure 3.D.6	<i>Effets de l'exposition extracellulaire de myocytes à la CsA sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence et en absence de CaN-AF</i>	171
Figure 3.D.7	<i>Effets de la dialyse de CaN constitutivement active sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP</i>	173
Figure 3.D.8	<i>Effet isoforme-spécifique de la CaNA sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artère pulmonaire</i>	174
Figure 3.D.9	<i>Immunobuvardage de CaNAα et β dans le muscle lisse d'artères pulmonaires</i>	176
Figure 3.D.10	<i>Translocation isoforme-spécifique de la CaNA par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires</i>	178

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Figure 4.A.1	<i>Modèles cinétiques de l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ en fonction du potentiel membranaire et du Ca^{2+}</i>	185
Figure 4.D.1	<i>Schéma de la régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des cellules musculaires lisses artérielles par les enzymes activées par le niveau de Ca^{2+} intracellulaire</i>	211

Liste des sigles et abréviations

AC	Artère coronaire
ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AE1	« Anion Exchanger 1 »
AFF	Acide flufénamique
AMC	Acide méclofénamique
AMF	Acide méfénamique
AMPA	« Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate »
AMP-PNP	Adénosine 5'-(β , γ -imido)triphosphate
ANF	Acide niflumique
AngII	Angiotensine II
AP	Artère pulmonaire
ARIP	Peptide inhibiteur de CaMKII (Autocamtide-2-related inhibitory peptide)
ARV	Augmentation régulatrice du volume
ATF	Acide tolfénamique
ATP	Adénosine 5'-trisphosphate
B ₁ et B ₂	États cinétiques inhibés 1 et 2
BAPTA	« 1,2-Bis(2-aminophenoxy)athane-N,N,N',N'-tetraacetic acid »
BK _{Ca}	Canal potassique à grande conductance activé par le Ca ²⁺
BSA	Albumine sérale de boeuf
C	État cinétique fermé
Ca ²⁺	Calcium

$[Ca^{2+}]_i$	Concentration intracellulaire de calcium
$Ca_{(L)}$	Canal calcique de type L
$Ca_{(T)}$	Canal calcique de type T
CaM	Calmoduline
CaMKII	Calmoduline Kinase II
CaN	Calcineurine
CaNA	Calcineurine A (sous-unité A de la CaN)
CaNB	Calcineurine B (sous-unité B de la CaN)
CaN-AF	« Calcineurin autoinhibitory fragment »
CFTR	« Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator » (canal)
Cl^-	Chlore (ou chlorure dans le cas d'un canal)
CLCA	Canal chlorure activé par le calcium (dans une cellule transfectée)
Cl_{Ca}	Canal chlorure activé par le calcium (dans une cellule native)
CLIC	Canal Cl^- intracellulaire
Cl_{vol}	Canal Cl^- sensible au volume cellulaire
CML	Cellule musculaire lisse
CNSC	Canaux non-sélectifs aux cations
CPAE	Cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines en culture
Cs^+	Ion Césium
CsA	Cyclosporine A
Cy5	Indodicarbocyanine
CypA	Cyclophiline A
DABCO	Diazabicyclo [2.2.2] octane

DCDPC	« 3,5-dichlorophenylamine-2-carboxylic acid »
DIDS	« 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid »
DMSO	Diméthylsulphoxide
DMV	Dystrophie maculaire vitelliforme
DNDS	« 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid »
DRV	Diminution régulatrice du volume
DTT	dithiothréitol
E_{Ca50}	Concentration de Ca^{2+} nécessaire à l'activation semi-maximale
E_{Cl}	Potentiel d'inversion des ions Cl^-
EDHF	« Endothelium-derived hyperpolarizing factor »
EGTA	« Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid »
E_m	Potentiel de repos membranaire théorique
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
FITC	« Fluorescein isothiocyanate »
FK	Fibrose kystique
G	Conductance macroscopique
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GABAR	Récepteur au GABA
GluR	Récepteur au glutamate
GlyR	Récepteur à la glycine
HCO_3^-	Ion bicarbonate
HEPES	« 4-(2-hydroxyméthyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid »
I	Courant macroscopique

IC ₅₀	Concentration à laquelle est obtenue une inhibition semi-maximale
I _{Cl(Ca)}	Courant macroscopique généré par les canaux Cl _{Ca}
IL-2	Interleukine-2
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
IP ₃ R	Récepteur à l'IP ₃
IV	Courant-voltage (relation)
K ⁺	Ion potassique
K _i	voir IC ₅₀
K _{IR}	Canal potassique « à rectification entrante »
K _m	Concentration de substrat pour que la vitesse enzymatique soit équivalente à la moitié de V _{max}
KN-93	« N-[2-[N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylaminomethyl]phenyl]-N-(2-hydroxyethyl)-4-methoxybenzenesulfonamide »
K _V	Canal potassique « dépendant du voltage » ou à « rectification retardée »
LTP	« Long-term potentiation »
ML-7	« 1-(5-iodonaphtalene-1-sulfonyl)1H-hexahydro-1,4-diazepine »
MLCK	kinase des chaînes légères de la myosine
Na ⁺	Ion sodique
NFAT	« Nuclear factor for activated T-lymphocyte »
NMDA	« N-methyl-D-aspartic acid »
O ₁ , O ₂ et O ₃	États cinétiques ouverts 1, 2 et 3
PA	Potentiel d'action
pA	Picoampères

PBS	Solution tampon physiologique
PDZ	Type de domaine d'interactions protéiques
PLC	Phospholipase C
PE	Phényléphrine
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PM	Potentiel membranaire
PMCA	« Plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase » (pompe calcique membranaire)
PP1	« Protein phosphatase 1 »
PP2A	« Protein phosphatase 2A »
RII	Fragment peptidique de la sous-unité régulatrice de type II de la PKA
RE	Réticulum endoplasmique
RS	Réticulum sarcoplasmique
RyR	Récepteur à la Ryanodine
SERCA	« Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase » (pompe Ca^{2+} du réticulum sarco- ou endoplasmique)
SITS	« 4-acetamido-4'-isothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonic acid »
SNA	Sérum normal d'âne
SNC	Sérum normal de chèvre
SSP	Solution saline physiologique
STICs	Courant transitoire entrant spontané (spontaneous transient inward currents)

TEA	Tetraéthylammonium
TriTC	« Tetramethyl rhodamine isothiocyanate »
$V_{0.5}$	Voltage menant à l'activation semi-maximale
VDAC	« Voltage-dependant anion channel »
V_m	Potentiel membranaire imposé
V_{\max}	Vitesse enzymatique maximale
VP	Veine porte

Dédicace

À ma belle et tendre Kalinda,

Tu as toujours été là, tant dans les moments pénibles où tu m'as permis de garder le moral que dans les explosions de bonheur afin de partager ces doux instants d'extase. Source inépuisable de motivation et exemple de dépassement de soi, tu m'as, maintes et maintes fois permis de repousser mes limites et d'aller toujours de l'avant.

Remerciements

Mes remerciements iront tout d'abord à mon directeur de recherche, le Dr Normand Leblanc. Tout au long de mes études graduées, il a été mon guide et m'a permis de découvrir le merveilleux monde de la science et de l'électrophysiologie. Sa grande disponibilité, sa patience, son soutien, sa persévérance, son enthousiasme sans fin et, bien entendu, son inaltérable passion pour la recherche ont toujours été un exemple, nourrissant chez moi le désir d'explorer plus à fond et d'approfondir mes connaissances. Bref, il a fourni un environnement plus que favorable à l'éclosion de ma passion pour la science. Merci du fond du cœur Normand!

Je remercie également mon codirecteur, le Dr Rémy Sauvé, qui en acceptant la codirection de mon doctorat, m'a permis de vivre une expérience sans pareil à University of Nevada, Reno. Merci également pour vos judicieux conseils.

Je voudrais également remercier les gens dotés d'une grande patience qui m'ont montré les techniques nécessaires à mes travaux de recherche et qui étaient toujours là, prêts à aider lorsqu'un problème survenait. Merci Marie-Andrée Lupien, Denis Chartier et Louis R. Villeneuve. Sans vous, mon doctorat et mon séjour à l'Institut de Cardiologie de Montréal n'auraient pas du tout été les mêmes.

Un merci tout spécial à Iain A. Greenwood (St George's Hospital Medical School, Londres, Grande-Bretagne), celui qui a su me montrer par sa personnalité et son incorruptible optimisme que le monde de la science, c'est aussi des gens avec qui on peut rire et s'éclater. Thank you so much, Iain. Merci également pour les enrichissantes discussions, scientifiques et autres, et aussi pour avoir réalisé les expériences sur l'action de CaMKII dans les myocytes d'artère pulmonaire et de la veine porte.

Le Dr Brain Perrino, de University of Nevada, Reno, nous a procuré les enzymes constitutivement actives (CaMKII, CaNA α et CaNA β) et a également réalisé l'immunobuvardage avec les CaNA α et CaNA β . Merci beaucoup.

L'Institut de Cardiologie de Montréal, fournissant un environnement propice à la recherche fondamentale et au développement des étudiants gradués, a également pris une place importante dans mes études. Merci.

Merci également aux organismes subventionnaires tels que les Instituts de Recherche en Santé du Canada et la Faculté des études supérieures nous permettant de continuer nos recherches et de nous y consacrer pleinement.

Bien entendu, je tiens à remercier profondément ceux qui ont toujours su m'encourager et me soutenir depuis le tout début. Vous avez toujours été là pour moi et je vous en serai toujours extrêmement redevable. Les proches sont d'une grande influence dans le développement d'un individu et je vous dois une partie de ce doctorat. Merci à mes parents Jacques et Marielle, ma famille, la famille McCraw et mes amis.

Finalement, je remercie celle qui m'a toujours appuyé. Merci ma douce et tendre Kalinda d'avoir fait tant de sacrifices afin de me permettre de me réaliser professionnellement et de m'épanouir intellectuellement. Merci d'être ce que tu es, une conjointe merveilleuse et attentionnée. Je te serai éternellement reconnaissant.

Table des matières

<i>Abrégé</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>iii</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>viii</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>ix</i>
<i>Liste des sigles et abréviations</i>	<i>xiii</i>
<i>Dédicace</i>	<i>xix</i>
<i>Remerciements</i>	<i>xx</i>

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION **3**

<i>Généralités</i>	4
--------------------------	----------

<i>Première partie : Les canaux chlorures</i>	14
---	-----------

<u>Section A Biologie moléculaire</u>	14
---	-----------

A.1 Canaux intracellulaires (CLIC)	15
--	-----------

A.2 Canaux associés à un récepteur	17
--	-----------

A.3 « Cystic fibrosis transmembrane regulator » (CFTR)	20
--	-----------

A.4 Canaux Cl ⁻ voltage-dépendants (ClC)	24
---	-----------

A.5 Canaux Cl ⁻ activés par le calcium (CLCA)	31
--	-----------

A.6 Bestrophines	40
------------------------	-----------

<u>Section B Canaux Cl⁻ endogènes</u>	42
--	-----------

B.1 Canaux Cl ⁻ sensibles au volume (Cl _{vol})	43
---	-----------

B.2 Canaux Cl ⁻ activés par le calcium (Cl _{Ca}) endogènes	47
---	-----------

<i>Deuxième partie : Ca²⁺, calmoduline et enzymes</i>	67
--	-----------

<u>Section C Kinase dépendante de la calmoduline (CaMKII)</u>	68
---	-----------

C.1 Structure de CaMKII	69
-------------------------------	-----------

C.2 Mécanismes d'activation	70
-----------------------------------	-----------

C.3 Pharmacologie	74
-------------------------	-----------

C.4 Rôles physiologiques	75
--------------------------------	-----------

Chapitre 1 : Introduction

<i>Généralités</i>	4
<i>Première partie : Les canaux chlorures</i>	14
<u>Section A Biologie moléculaire</u>	14
<u>Section B Canaux Cl^- endogènes</u>	42
<i>Deuxième partie : Ca^{2+}, calmoduline et enzymes</i>	67
<u>Section C Kinase dépendante de la calmoduline (CaMKII)</u>	68
<u>Section D Calcineurine</u>	77
<u>Section E : Justification et objectifs</u>	87

Généralités

Le tonus vasculaire a pour fonction d'assurer l'apport variable mais essentiel en oxygène, nutriments, hormones, etc. aux différents tissus et viscères via les vaisseaux sanguins en réponse à leurs besoins spécifiques et respectifs. De par son importance vitale, le tonus vasculaire est contrôlé de façon très serrée par une panoplie de substances libérées localement (facteurs dérivés de l'endothélium, neurotransmetteurs) ou provenant de la circulation (hormones) et par des mécanismes locaux impliquant une réactivité des cellules musculaires lisses elles-mêmes, tel le tonus myogénique au niveau des artérioles et artères de résistance. Le tonus myogénique se définit comme étant un mécanisme local de régulation minutieuse du niveau de contraction des cellules musculaires lisses (CML) vasculaires en réponse à un changement de pression transmurale. Le rôle physiologique de ce mécanisme est de conserver un flot sanguin constant aux organes (pour références, voir (Davis & Hill, 1999; Komaru *et al.*, 2000)). Les myocytes vasculaires réagissent donc eux-mêmes à l'augmentation de la pression hydrostatique en se contractant indépendamment d'une influence hormonale, neuronale ou même de l'endothélium (figure 1.1) (Davis & Hill, 1999). Les mécanismes impliqués dans le tonus myogénique ne sont pas encore clairs mais il semble, entre autres, que des canaux anioniques soient impliqués (Nelson *et al.*, 1990; Remillard *et al.*, 2000).

En plus de cette autorégulation, l'état de contractilité des CML vasculaires est fortement influencé de façon locale (endothélium) et systémique (hormones,

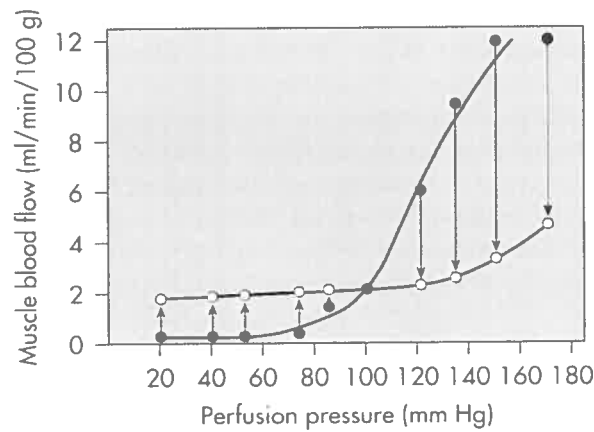


Figure 1.1 *Courbe d'autorégulation*

Relation pression de perfusion et flot sanguin du lit vasculaire squelettique de chien. Les cercles noirs représentent le flot mesuré immédiatement après le changement brusque de pression de perfusion alors que les cercles blancs représentent le flot en régime établi à la nouvelle pression. Tirée de (Berne & Levy, 1997)

cytokines et peptides vasoactifs). De fait, l'endothélium joue un rôle majeur dans la régulation locale de la contraction des CML vasculaires de par la libération d'agents vasodilatateurs tels que l'oxyde nitrique (NO) et les prostaglandines (e.g. PGI₂) (Faraci & Heistad, 1998), l'EDHF (Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor) (Feletou & Vanhoutte, 2000) ainsi que la formation d'AngII qui provoque la contraction (Touyz & Schiffrin, 2000). D'autre part, la libération d'hormones (histamine, endothéline) ou de neurotransmetteurs (noradrénaline, sérotonine) est également un processus important de contrôle du tonus vasculaire (Kedzierski & Yanagisawa, 2001; Ortega & de Artinano, 1997; Miyauchi & Masaki, 1999; MacCarthy *et al.*, 2001; Komaru *et al.*, 2000).

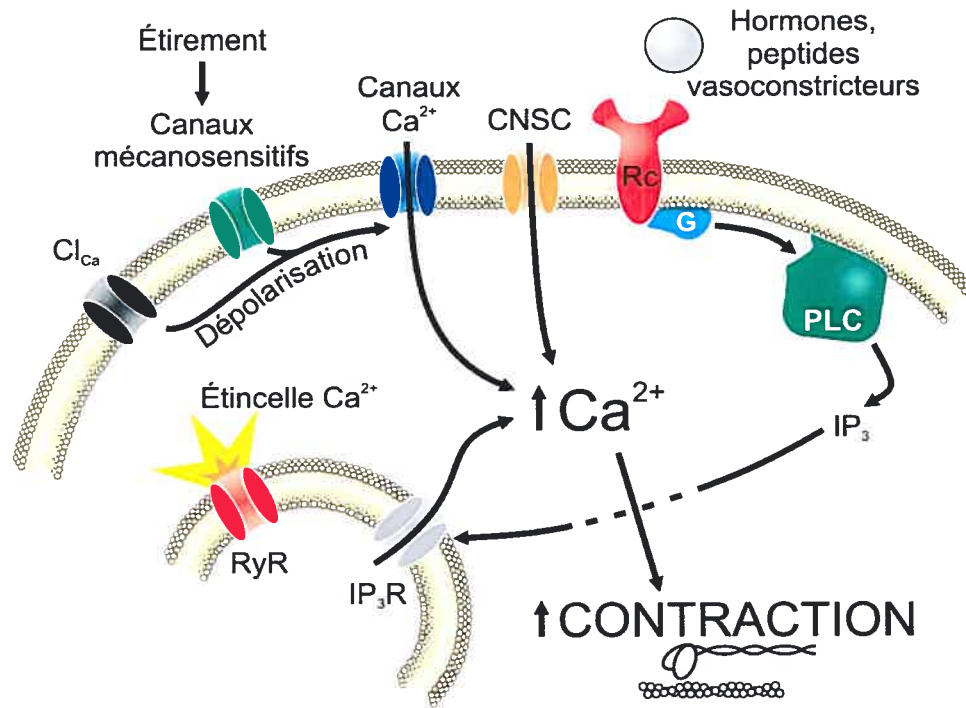


Figure 1.2 Mécanismes d'augmentation du calcium cytoplasmique des cellules musculaires lisses

IP₃ : Inositol trisphosphate; Rc : Récepteur; PLC : Phospholipase C; G : Protéine G; RyR : Récepteurs sensibles à la Ryanodine; IP₃R : Récepteurs à l'IP₃; CNSC : Canaux non-sélectifs aux cations; Cl_{Ca} : Canaux Cl⁻ activés par le Ca²⁺. Modifiée de : (Ledoux et al., 2003)

La contraction musculaire lisse

Tel que mentionné précédemment, le tonus vasculaire est tributaire de l'état de contractilité des CML qui tapissent la paroi des vaisseaux sanguins. Cet état de contractilité du myocyte vasculaire dépend essentiellement du niveau de calcium cytoplasmique ou intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$) tout comme pour les muscles squelettique et cardiaque. Toutefois, contrairement aux muscles squelettique et cardiaque, le

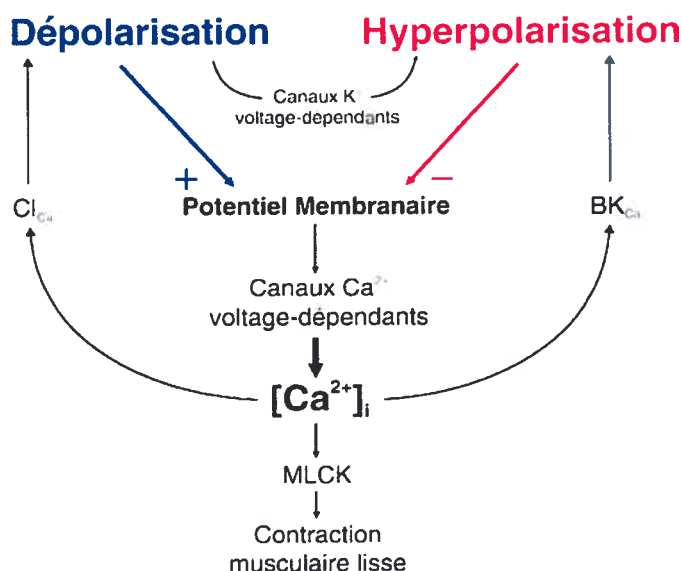


Figure 1.3 *Couplage excitation-contraction dans le muscle lisse vasculaire*

$[Ca^{2+}]_i$: Concentration intracellulaire en Ca^{2+} ; BK_{Ca} : Canaux potassiques à grande conductance activés par le Ca^{2+} ; Cl_{Ca} : Canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} ; **MLCK**: Protéine kinase des chaînes légères de la myosine. Adapté de: (Jaggard *et al.*, 2000; Nelson & Quayle, 1995)

principal ligand calcique impliqué dans la contraction est la calmoduline (CaM) et non la troponine (Stull *et al.*, 1996; Allen & Walsh, 1994). La contraction musculaire lisse découlant généralement d'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, la majorité des stimuli régulant l'état de contractilité des CML impliquent des mécanismes modifiant le niveau de calcium intracellulaire (figure 1.2). La libération du Ca^{2+} contenu dans le RS via les récepteurs à l' IP_3 (IP_3R) ou les récepteurs à la ryanodine (RyR) initie le processus de contraction. De plus, l'ouverture de canaux ioniques se trouvant à la membrane plasmique permet l'entrée massive d'ions Ca^{2+} venant du milieu extracellulaire, résultant ainsi en une contraction du myocyte. Le contrôle de l'ouverture de ces canaux est par conséquent un enjeu majeur dans la régulation de la

contraction musculaire. D'ailleurs, étant donné la grande sensibilité au potentiel membranaire (PM) des canaux calciques voltage-dépendants, une légère modification du PM peut être suffisante pour provoquer ou empêcher la contraction. D'importants systèmes de régulation (rétroactions positive et négative) du PM sont présents dans le muscle lisse tel qu'illustré à la figure 1.3 et démontrent l'importance du PM dans le couplage excitation-contraction des myocytes vasculaires. D'autre part, l'extrusion du Ca^{2+} contenu dans le cytoplasme est également très important dans l'homéostasie calcique. Afin de réduire la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et de permettre la relaxation du myocyte, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et une pompe Ca^{2+} ATPase (PMCA) se trouvant à la membrane plasmique évacuent le Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire. Également, une pompe Ca^{2+} ATPase (SERCA) permet d'accumuler le Ca^{2+} dans le RS tout en diminuant la quantité de Ca^{2+} contenue dans le cytoplasme (Strehler & Treiman, 2004; Marin *et al.*, 1999; Schuh *et al.*, 2003). D'ailleurs, l'importante quantité de Ca^{2+} contenue dans le RS résultante de l'action de SERCA permet une libération via les RyR et les IP_3R .

Le potentiel membranaire

Comme pour les autres types de cellules excitables, le PM des CML est la résultante de la distribution asymétrique des ions de part et d'autre de la membrane plasmique. Effectivement, l'action de pompes et d'échangeurs ioniques crée une accumulation de certains ions (Cl^- et K^+) à l'intérieur des myocytes alors qu'elle en expulse d'autres (Ca^{2+} et Na^+) afin de diminuer leur concentration intracellulaire, ce

qui a pour effet de provoquer des potentiels d'inversion différents pour chacun des ions. Le potentiel membranaire résulte de la conductance relative de chacun des ions à travers la membrane et du gradient électrochimique de ces ions de part et d'autre de la membrane, qui peut être défini par l'équation de Goldman-Hodgkins-Katz (Hille, 1992).

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{Na}[Na]_o + P_K[K]_o + P_{Cl}[Cl]_i}{P_{Na}[Na]_i + P_K[K]_i + P_{Cl}[Cl]_o}$$

où E_m : potentiel de repos membranaire; R : constante des gaz parfaits; T : température absolue en degrés Kelvin; F : constante de Faraday; P_x : perméabilité de l'ion X; $[X]_i$: concentration intracellulaire de l'ion X et $[X]_o$: concentration extracellulaire de l'ion X (Hille, 1992).

Notons que la valeur obtenue est celle d'un potentiel membranaire basal sans l'influence de pompes électrogéniques. Le PM basal des myocytes vasculaires oscille entre -45 et -60 mV *in vivo* (Nelson *et al.*, 1990; Kuriyama *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter qu'au niveau de l'artère pulmonaire de lapin, Casteels *et coll.* (1977) ont rapporté un PM basal de -57 mV (Casteels *et al.*, 1977). L'ouverture de canaux ioniques permet le passage de plusieurs millions d'ions à la seconde avec une extrême précision quant au type d'ions traversant le canal (Hille, 1992). Ce flot d'ions s'exprime en un déplacement de charges qui se traduit par une modification du PM. Par conséquent, l'ouverture et la fermeture de canaux ioniques influencent la contraction musculaire via leur impact sur le PM et donc sur l'ouverture des canaux Ca^{2+} .

Les canaux ioniques

La membrane plasmique des CML vasculaires contient des canaux perméables aux ions Ca^{2+} , K^{+} , Cl^{-} ou encore non sélectifs aux cations (CNSC). On rapporte également, dans certaines préparations de muscle lisse, des canaux perméables aux ions Na^{+} (Bolton *et al.*, 1999; Deshpande *et al.*, 2002).

Deux types de ces canaux voltage-dépendants et sélectifs aux ions Ca^{2+} sont généralement retrouvés au niveau des CML, soit les canaux Ca^{2+} à haut (de type L pour « long-lasting » ou $\text{Ca}_{(L)}$) et bas (de type T pour « transient » ou $\text{Ca}_{(T)}$) seuils (références : (McDonald *et al.*, 1994)). Toutefois, seul $\text{Ca}_{(L)}$ fut observé dans les myocytes d'artères coronaires et pulmonaires ainsi que dans la veine porte de lapin (Cox *et al.*, 1992; Clapp & Gurney, 1991; Matsuda *et al.*, 1990). Les relations sigmoïdales de l'activation (d_{∞}) et de l'inactivation (f_{∞}) en régime établi des $\text{Ca}_{(L)}$ se superposent pour former une zone de recouvrement appelée « courant de fenêtre », qui prédit qu'une dépolarisation dans cette zone pourrait initier un courant calcique en régime établi (figure 1.4) (McDonald *et al.*, 1994; Fleischmann *et al.*, 1994). Au niveau des cellules musculaires lisses, cette zone débute autour du seuil d'activation des $\text{Ca}_{(L)}$, soit aux environs de -40 mV, et elle atteint son zénith autour de -20 mV, ce qui correspond au potentiel d'inversion des ions Cl^{-} des CML ($E_{\text{Cl}} \approx -24$ mV). Ceci implique qu'une élévation du potentiel membranaire au repos, de -45 mV à -30 mV provoque l'ouverture de canaux calciques et un influx calcique soutenu. En fait, avec un potentiel membranaire au repos de -45 mV, une simple dépolarisation de 3 mV suffit pour doubler le flot d'ions Ca^{2+} passant à travers les canaux $\text{Ca}_{(L)}$

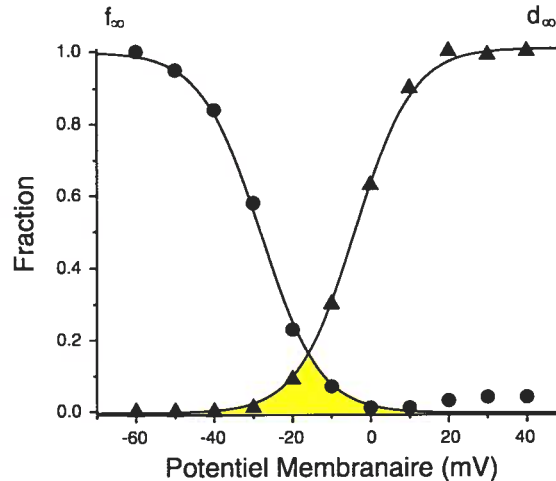


Figure 1.4 « Courant de fenêtre » calcique en régime établi via $Ca_{(L)}$ des CML d'artères coronaires de lapin

d_{∞} : activation en régime établi; f_{∞} : inactivation en régime établi; **région en jaune** : « courant de fenêtre » où à ces potentiels membranaires, les courants calciques de type L sont ouverts de façon soutenue, et correspond à la rencontre de la courbe d'activation et d'inactivation de $Ca_{(L)}$ en régime établi. *Modifié de (McDonald et al., 1994)*

permettant ainsi à une quantité supérieure de Ca^{2+} de pénétrer dans le cytoplasme et d'induire une contraction (Nelson & Quayle, 1995). La grande sensibilité au voltage de ce mécanisme démontre l'importance de mieux comprendre les facteurs responsables de la régulation fine du PM basal des cellules musculaires lisses.

Par ailleurs, la membrane des CML comprend plusieurs types de canaux perméables aux ions K^{+} et dont l'activité permet à la cellule de maintenir un PM en dehors de la zone fenêtrée des $Ca_{(L)}$ discutée ci-haut. Ils ont donc pour rôle de diminuer l'état de contractilité cellulaire. Étant donné le potentiel d'inversion très négatif des ions potassiques (≈ -85 mV) (pour références : (Nelson & Quayle, 1995)), l'ouverture de canaux perméables au K^{+} provoque une hyperpolarisation de la

membrane, tendant à ramener le potentiel membranaire au potentiel d'équilibre du potassium. En ce qui concerne les myocytes vasculaires, principalement quatre différents types de ces canaux ont été identifiés (Nelson & Quayle, 1995). Tout d'abord, les canaux potassiques à grande conductance activés par le Ca^{2+} (BK_{Ca}) sont activés par une dépolarisation de la membrane et sont également sensibles à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cette sensibilité au Ca^{2+} est accentuée par une sous-unité β , ce qui confère une grande importance à cette sous-unité dans la régulation du tonus vasculaire (Brenner *et al.*, 2000). On retrouve également des canaux potassiques « dépendants du voltage » (K_V), également appelés « à rectification retardée » (delayed-rectifier) à la membrane plasmique des myocytes vasculaires. Un troisième type de canal potassique présent dans les CML vasculaires est caractérisé par sa sensibilité au ratio entre l'ATP et l'ADP intracellulaire suggérant ainsi son implication dans la réponse à l'état métabolique du myocyte (références : (Yokoshiki *et al.*, 1998; Knot *et al.*, 1996; Nelson & Quayle, 1995; Cole & Clement-Chomienne, 2003)). Un canal potassique « à rectification entrante » (K_{IR}) est aussi retrouvé chez les myocytes vasculaires. Contrairement aux BK_{Ca} et K_V , K_{IR} est activé par une hyperpolarisation.

Des canaux sélectifs aux ions sodiques (Na^+), voltage-dépendants et sensibles à la tétródotoxine ont également été rapportés dans plusieurs préparations musculaires lisses (Bolton *et al.*, 1999) incluant les tissus vasculaires (Okabe *et al.*, 1988; Cox *et al.*, 1998; Choby *et al.*, 2000; Quignard *et al.*, 1997). Également, des canaux non sélectifs aux cations activés par divers ligands (ATP, noradrénaline, etc.) (Benham *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1997b; Amedee *et al.*, 1990) ou par l'étirement

(mécanosensitifs) (Hamill & McBride, Jr., 1994) ont été identifiés dans certains lits vasculaires.

Finalement, des canaux permettant le passage d'anions ont été identifiés. Ces canaux portent l'appellation de canaux chlorures, ce qui est dû au fait que le chlore est l'anion le plus abondant physiologiquement plutôt qu'en raison d'une sélectivité supérieure de ces canaux aux ions Cl^- par rapport aux autres anions tels que HCO_3^- . Deux classes de canaux Cl^- ont été caractérisées dans les myocytes vasculaires. Les canaux sensibles au volume (Cl_{vol}) sont activés par des changements du volume cellulaire ou de l'osmolarité. D'autre part, le canal faisant l'objet de la présente étude, soit le canal Cl^- activé par le $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Cl_{Ca}) a également été identifié au niveau des cellules musculaires lisses. Néanmoins, les canaux Cl^- font maintenant l'objet de nombreuses études visant à les caractériser et à identifier les gènes codants.

Première partie : Les canaux chlorures

Des canaux perméables aux anions sont non seulement exprimés dans les cellules musculaires lisses, mais également de façon ubiquitaire chez les eucaryotes et sont même présents chez les procaryotes. Ils remplissent diverses fonctions telles que la régulation du volume et de l'excitabilité cellulaire de même que le contrôle de la libération du calcium contenu dans le réticulum sarcoplasmique tel qu'il sera élaboré dans cette *première partie*. Plusieurs classes de protéines clonées sont postulées comme étant des canaux perméables aux anions et feront l'objet de la présente portion de l'*Introduction*. Finalement, les courants anioniques observés dans les myocytes vasculaires seront traités dans le cadre de courants semblables observés dans d'autres tissus ainsi qu'en comparaison avec les propriétés des canaux Cl^- clonés.

Section A : Biologie moléculaire

En raison de l'importance souvent cruciale des canaux Cl^- observés par les électrophysiologistes, les dernières décennies ont donné lieu à un engouement accru envers ces protéines afin d'en déterminer l'identité moléculaire. Jusqu'à présent, six familles génétiques de canaux anioniques ont été identifiées: 1) les canaux Cl^- intracellulaires (CLIC); 2) les canaux Cl^- associés à un récepteur; 3) le canal « Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator » (CFTR); 4) les canaux Cl^- dépendants du

voltage (CLIC); 5) les canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} (CLCA); et tout récemment 6) les bestrophines.

A.1 Canaux intracellulaires (CLIC)

Le mouvement de charges induit par la libération du Ca^{2+} du RS dans le cytoplasme via les récepteurs à la ryanodine (RyR) et à l' IP_3 (IP_3R) ou sa recapture par la Ca^{2+} -ATPase implique un changement de potentiel du RS, ce qui aurait pour effet de freiner le passage d'ions Ca^{2+} . Par conséquent, l'existence d'un contre-courant permettrait le maintien d'un potentiel membranaire neutre au niveau du RS même durant le mouvement des ions Ca^{2+} (Somlyo *et al.*, 1981; Dulhunty *et al.*, 2001).

Pollock *et al.* (1998) ont démontré que certains inhibiteurs des canaux Cl^- (NPPB et IAA-94) empêchaient la recapture du Ca^{2+} du cytoplasme de cellules musculaires lisses indépendamment d'un effet direct sur la pompe Ca^{2+} -ATPase (Pollock *et al.*, 1998). Ceci suggère qu'une conductance anionique aurait effectivement un effet permissif sur le mouvement des ions Ca^{2+} à travers la membrane du RS. Plusieurs études ont également rapporté la présence de courants Cl^- via la fusion de vésicules isolées du RS et du réticulum endoplasmique (RE) dans des bicouches lipidiques. Des résultats hétérogènes suggèrent cependant qu'il existe plusieurs types différents de canaux Cl^- dans le RE et le RS (Kourie *et al.*, 1996b; Kourie *et al.*, 1996a; Eliassi *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1997; Tanifuji *et al.*, 1987; Rousseau *et al.*, 1996). La localisation de ces canaux est le principal facteur

limitant pour l'étude de ceux-ci. De ce fait, l'identification moléculaire de telles protéines aiderait grandement la caractérisation de ces canaux et permettrait l'élaboration d'expériences favorisant leur surexpression ou leur suppression.

Récemment, une famille de protéines, les CLIC (« Cl⁻ Intracellular Channels »), a été identifiée et est jusqu'à présent composée de sept membres (p64, CLIC1 à 5 et parchorin). Il est postulé que ces protéines, caractérisées par une localisation intracellulaire, forment des pores perméables aux anions (référence : (Ashley, 2003)).

Tel que l'indique la nomenclature, les différents membres de la famille des CLIC sont principalement retrouvés au niveau des membranes intracellulaires, soit la membrane nucléaire, les vésicules, le réticulum endoplasmique et même la mitochondrie. Toutefois, une localisation à la membrane plasmique a également été rapportée pour certains CLIC. Notons un cas intéressant, celui de la parchorine. En effet, lorsque exprimée, la protéine se retrouve dans le cytoplasme mais en réponse à une stimulation, il y a translocation de la protéine vers la membrane plasmique (Nishizawa *et al.*, 2000; Urushidani *et al.*, 1999).

La topologie transmembranaire des différents CLIC n'est cependant pas encore connue (1 à 2 segments transmembranaires) bien que la configuration ne présentant qu'un seul passage transmembranaire soit peu probable (Ashley, 2003). De récents travaux ont révélé la structure cristallographique de CLIC1 (Harrop *et al.*, 2001). Il est alors proposé que CLIC1 existe sous la forme soluble et peut, suite à un changement de conformation, s'insérer à la membrane (Warton *et al.*, 2002),

parallèlement à ce qui a été suggéré pour la parchorine (Nishizawa *et al.*, 2000; Urushidani *et al.*, 1999).

Peu d'études biophysiques ou pharmacologiques ont été réalisées sur les différents CLIC. En fait, seuls p64, CLIC1 et CLIC4 ont fait l'objet de travaux portant sur les propriétés biophysiques et pharmacologiques. Ils présentent tous une rectification sortante, des conductances unitaires variant entre 22 et 68 pS et une sensibilité à certains inhibiteurs classiques des canaux Cl^- (Edwards *et al.*, 1998; Valenzuela *et al.*, 1997; Tulk *et al.*, 2000; Duncan *et al.*, 1997). Valenzuela *et al.* (1997) ont de plus rapporté une séquence de perméabilité pour CLIC1 donnée par : $\text{Br}^- \approx \text{Cl}^- > \text{I}^-$ (Valenzuela *et al.*, 1997). Toutefois, il est à noter que ces propriétés diffèrent énormément de celles des canaux Cl^- fraîchement isolés du RS ou du RE.

A.2 Canaux associés à un récepteur

L'inhibition synaptique du système nerveux central, principalement par l'action de deux neurotransmetteurs, la glycine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA), est en fait la résultante de l'activation de canaux Cl^- associés aux récepteurs à la glycine (GlyR) et au récepteur GABAergique de type A (GABA_AR) (Ashcroft, 2000; Jentsch *et al.*, 2002). Selon le potentiel d'inversion des ions Cl^- des neurones et contrairement aux cellules musculaires lisses, l'ouverture de ces canaux induit généralement une hyperpolarisation de la membrane synaptique diminuant ainsi la propension de la membrane post-synaptique à se dépolariser et rendant plus difficile son excitation par un neurotransmetteur excitant, d'où l'inhibition synaptique.

Bien qu'un seul type GlyR ait été identifié, trois types de récepteurs au GABA sont généralement retrouvés, mais seuls GABA_AR et GABA_CR génèrent un courant anionique lorsque activés par le GABA, le GABA_CR étant moins sensible au neurotransmetteur (Jentsch *et al.*, 2002). Les GlyR et GABA_AR partagent bon nombre de caractéristiques telles que la structure tertiaire et quaternaire ainsi que certaines propriétés biophysiques (perméabilité et niveaux multiples de conductance) et pharmacologiques (activation commune par certains composés).

Tous deux résultent d'un agencement pentamérique où chacune des sous-unités comporte quatre passages transmembranaires et des segments amino- et carboxy-terminaux extracellulaires. Alors que la sous-unité α des GlyR et GABA_AR est responsable du courant anionique associé à la liaison du neurotransmetteur, les sous-unités α et β sont impliquées dans la liaison du ligand. La sous-unité β lie également la gephyrine et est essentielle au regroupement des récepteurs (TIPS Supplement, 2001). Notons que pour les GABA_AR, il existe plusieurs types de sous-unités α (6), β (3) et γ (3) et que les différentes combinaisons de ces sous-unités confèrent des propriétés distinctes au canal ainsi formé (Jentsch *et al.*, 2002).

D'un point de vue électrophysiologique, une séquence de perméabilité de $I^- > Br^- > Cl^-$ a été rapportée (Jentsch *et al.*, 2002). Des niveaux multiples de conductance de 10 à 45 pS et de 10 à 90 pS ont été observés pour les GABA_AR et les GlyR, respectivement. Les deux types de canaux sont activés par l'éthanol et par des anesthésiques volatiles tels que l'isoflurane et l'enflurane. Les GABA_AR sont également la cible de plusieurs composés cliniquement importants comme des antiépileptiques, anxiolytiques, sédatifs, relaxants musculaires, etc. En fait, les

barbituriques et les benzodiazépines potentialisent la réponse au GABA plutôt qu'une activation du canal *per se*. D'autre part, certains composés tels que la picrotoxine et la bicuculline induisent des convulsions par l'inhibition du GABA_AR alors que la strychnine, poison utilisé depuis des siècles, cause une hyperexcitabilité neuronale, des spasmes musculaires et des convulsions dues à son action agoniste compétitif sur les GlyR.

Il est intéressant de noter une expression différentielle des sous-unités des GlyR dans le développement, suggérant ainsi un rôle différent des GlyR selon le stade développemental du système nerveux central (Malosio *et al.*, 1991). Une particularité intéressante du GABA_AR dans le développement est l'effet causé par l'activation du récepteur-canal. Dans les phases précoces du développement, l'activation de GABA_AR induit une dépolarisation due à une concentration intracellulaire élevée en Cl⁻ (Ben Ari *et al.*, 1997). La concentration intracellulaire en Cl⁻ diminue toutefois lors de la maturation neuronale de sorte que l'activation des GABA_AR induit à maturité une hyperpolarisation de la membrane post-synaptique, inhibant ainsi la stimulation synaptique par des neurotransmetteurs excitants.

Par le fait que le GABA soit le neurotransmetteur inhibiteur principal du cerveau, les gènes formant les GABA_AR constituent de bons candidats pour expliquer de nombreuses pathologies neurologiques bien qu'aucune pathologie humaine n'ait clairement été reliée aux GABA_AR jusqu'à présent. Une déficience des GlyR a toutefois été associée à la maladie de Kok (Shiang *et al.*, 1993), une pathologie qui est en fait un désordre neurologique autosomique dominant caractérisé par des

spasmes musculaires tels que des grimaces en réponse à des stimuli inattendus (« startle disease »).

A.3 « Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator » (CFTR)

La mucoviscidose, communément appelée fibrose kystique (FK), est la pathologie génétique la plus commune chez les caucasiens, avec 3400 Canadiens actuellement affectés par cette maladie et il est estimé qu'un nouveau-né sur 2500 est atteint de FK (Fondation Canadienne de la Fibrose Kystique, 2004). Cette pathologie affecte principalement les poumons et le tube digestif et est associée à une diminution de la sécrétion d'ions Cl^- par l'épithélium. En ce qui concerne les poumons, il en résulte une accumulation de mucus dense, foyer d'inflammation et d'infections bactériennes (Ashcroft, 2000). Le mucus épais du tube digestif empêche les enzymes digestives d'atteindre les intestins en obstruant les conduits pancréatiques (Ashcroft, 2000). De plus, une absence congénitale de *vas deferens* entraîne la stérilité chez les patients masculins (Fondation Canadienne de la Fibrose Kystique, 2004; Ashcroft, 2000; de Braekeleer & Ferec, 1996; Akabas, 2000).

Chez un individu sain, la sécrétion épithéliale des voies respiratoires et du tube digestif d'ions Cl^- est principalement effectuée par un canal, CFTR (« Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator »). Or, chez les gens affectés par la FK, une ou plusieurs mutations du gène (plus de 800 connues) codant pour ce canal le rendent inopérant, d'où une sécrétion d'ions Cl^- réduite (Hwang & Sheppard, 1999). Depuis

l'identification en 1989 du gène codant pour CFTR (Riordan *et al.*, 1989), ce membre de la famille des « ABC (ATP Binding Cassette) transporters » a fait l'objet, étant donné son importance pathophysiologique, de très nombreuses études et de plusieurs excellentes revues (Akabas, 2000; Morris, 1999; Csanady & Gadsby, 1999; Hwang & Sheppard, 1999; Kunzelmann, 1999; Kunzelmann & Schreiber, 1999; Zhang *et al.*, 2000; Ashcroft, 2000; Nilius & Droogmans, 2003; Jentsch *et al.*, 2002; Kunzelmann, 2001) et même, d'un supplément complet de *Physiological Reviews* en 1999 (Quinton, 1999; Sheppard & Welsh, 1999; Gadsby & Nairn, 1999; Schultz *et al.*, 1999; Schwiebert *et al.*, 1999; Kopito, 1999; Bradbury, 1999; Grubb & Boucher, 1999; Pilewski & Frizzell, 1999).

D'un point de vue structural, CFTR est constitué de deux domaines homologues de six segments transmembranaires reliés par un long domaine « R » (Régulateur) intracellulaire (Riordan *et al.*, 1989; Akabas, 2000). Chacun des segments contient un site de liaison pour nucléotide (NBD pour « Nucleotide Binding Domain »). Le domaine R qui contient de nombreuses séquences en consensus pour une phosphorylation par la protéine kinase A (PKA), C (PKC) et G (PKG) de type II (Kirk, 2000; Ostedgaard *et al.*, 2001) a pour rôle d'interagir avec les NBD et de moduler leur affinité pour l'ATP (Ostedgaard *et al.*, 2001). De plus, le segment carboxy-terminal de chaque moitié de CFTR contient un domaine d'interaction PDZ (Kunzelmann, 2001; Kirk, 2000). Ce domaine serait responsable de la localisation de CFTR à la membrane (Raghuram *et al.*, 2001) et pourrait également être impliqué dans la régulation par CFTR d'autres protéines (i.e. Cl_{Ca}, ENaC).

La séquence de perméabilité de CFTR aux halogènes est bien documentée : $I^- > Br^- > Cl^- > F^-$ (Anderson *et al.*, 1991; Sheppard & Welsh, 1999). La conductance unitaire d'un canal CFTR est de 10 pS et elle est ohmique en conditions symétriques de Cl^- . Le courant macroscopique généré par l'ouverture des canaux ne présente aucune activation en fonction du temps, indiquant que la probabilité d'ouverture est indépendante du potentiel membranaire (Zhang *et al.*, 2000). Malheureusement, aucun inhibiteur spécifique à CFTR n'a jusqu'à présent été rapporté (voir : (Schultz *et al.*, 1999)). Le canal est inhibé par les inhibiteurs classiques des canaux Cl^- (NPPB, DIDS, DPC, etc.) et par les sulfonylurés tels que le glibenclamide ($IC_{50} = 12-20 \mu M$) et le tolbutamide ($IC_{50} = 150 \mu M$) (Hwang & Sheppard, 1999).

Les mécanismes nécessaires à l'activation de CFTR sont particuliers et très caractéristiques à ce canal. L'activation du canal nécessite deux processus différents et distincts (voir : (Gadsby & Nairn, 1999)). Tout d'abord, des processus de phosphorylation (par PKC suivi de PKA) sont nécessaires à la susceptibilité du canal à être activé (Jia *et al.*, 1997). En fait, la phosphorylation du domaine R relève l'effet inhibiteur du domaine R sur les deux NBD du canal, ce qui augmente leur affinité pour l'ATP. La seconde étape implique la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Cette étape, nettement plus complexe et encore aujourd'hui sujette à débats, nécessite l'interaction fonctionnelle des deux NBD du canal. Essentiellement, il est en général admis que l'hydrolyse de l'ATP par le NBD1 induit l'ouverture du canal alors que l'hydrolyse de l'ATP au NBD2 provoque la fermeture du canal (Akabas, 2000; Csanady & Gadsby, 1999).

En plus de son rôle dans la sécrétion épithéliale via sa fonction « canal », de nombreuses évidences suggèrent l'implication de CFTR dans la régulation d'autres protéines, échangeurs et canaux ioniques (Kunzelmann & Schreiber, 1999; Schwiebert *et al.*, 1999). De fait, une interaction de CFTR avec les canaux Na^+ sensibles à l'amiloride (ENaC), les canaux Cl^- à rectification sortante (ORCC), l'échangeur $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ainsi que le canal K^+ (ROMK2) a été suggérée (Kunzelmann, 2001; Kunzelmann & Schreiber, 1999; Stutts *et al.*, 1995; Gabriel *et al.*, 1993; McNicholas *et al.*, 1996).

Des souris transgéniques, chez lesquelles le gène responsable de CFTR est inopérant ($\text{CFTR}^{-/-}$), ne présentent étrangement peu ou pas de symptômes au niveau des voies respiratoires (Grubb & Boucher, 1999). Par conséquent, une autre conductance, probablement Cl^- , prend la relève du CFTR déficient dans l'épithélium des voies respiratoires. Il a été suggéré que ce courant résulte en fait de l'activité d'un canal Cl^- activé par le calcium intracellulaire (Clarke *et al.*, 1994; Grubb *et al.*, 1994a; Tarran *et al.*, 2002; Grubb *et al.*, 1994b). De plus, l'expression de CFTR dans les oocytes de *Xenopus laevis* et dans les cellules CPAE induit l'inhibition des canaux Cl_{Ca} endogènes (Kunzelmann *et al.*, 1997; Wei *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001). Une telle conductance compensatoire (Cl_{Ca}) pourrait être une cible thérapeutique importante dans la lutte contre la FK.

A.4 Canaux Cl⁻ voltage-dépendants (ClC)

La grande famille de canaux anioniques sensibles au voltage, les ClC (« Cl⁻ Channels »), compte neuf membres chez les mammifères et plusieurs protéines analogues aux ClC sont également présentes chez d'autres eucaryotes et dans les procaryotes. La grande diversité et l'abondante expression des ClC ainsi que les fonctions physiologiques potentielles expliquent l'important intérêt suscité pour ces canaux tel qu'en témoigne le grand nombre d'articles de revue (Jentsch *et al.*, 2002; Jentsch *et al.*, 1999; Jentsch & Gunther, 1997; Nilius & Droogmans, 2003; Fahlke, 2001; Foskett, 1998; Maduke *et al.*, 2000; Uchida, 2000; Waldegger & Jentsch, 2000a).

Des études exhaustives portant sur ces canaux suggérèrent une structure particulière pour des canaux ioniques : un dimère en double-baril (Ludewig *et al.*, 1996; Middleton *et al.*, 1996; Saviane *et al.*, 1999; Waldegger & Jentsch, 2000b; Weinreich & Jentsch, 2001; Miller & White, 1984). Dans ce modèle, le canal serait formé de deux sous-unités formant chacune un pore (ou proto-canal) et possédant chacune une « gate » (ou porte) intrinsèque et rapide mais qui partageraient concurremment une « gate » lent commun pour le dimère entier. Contrairement à ce qui avait précédemment été avancé (Schmidt-Rose & Jentsch, 1997; Jentsch *et al.*, 1990; Fahlke *et al.*, 1997), la structure tertiaire d'un proto-canal serait composée de 18 hélices α assemblées de façon antiparallèle pour former une structure triangulaire d'une dimension totale d'environ 55 X 100 X 55 Å (figure 1.A.4-1) tel que démontré par cristallographie à haute résolution (jusqu'à 3 Å) d'homologues des ClC originaires de *E. Coli* (EcClC) et de *S. typhimurium* (StClC) (Dutzler *et al.*,

2002;Dutzler *et al.*, 2003;Mindell *et al.*, 2001). Notons que plusieurs des hélices ne traversent pas la membrane et aucune n'est orientée de façon classique, c'est-à-dire perpendiculaire à la membrane. Dans cette structure, les pores ne sont pas formés à l'interface des deux sous-unités, mais chaque sous-unité possède son propre pore et ces derniers seraient séparés par $\approx 25\text{--}40\text{\AA}$ (Dutzler *et al.*, 2002;Mindell *et al.*, 2001;Weinreich & Jentsch, 2001). Chacun des proto-canaux est formé d'un large vestibule extra- et intracellulaire et un pore étroit d'une longueur de 15\AA pouvant contenir jusqu'à trois ions Cl^- . La structure en dimère des ClC suggère également la

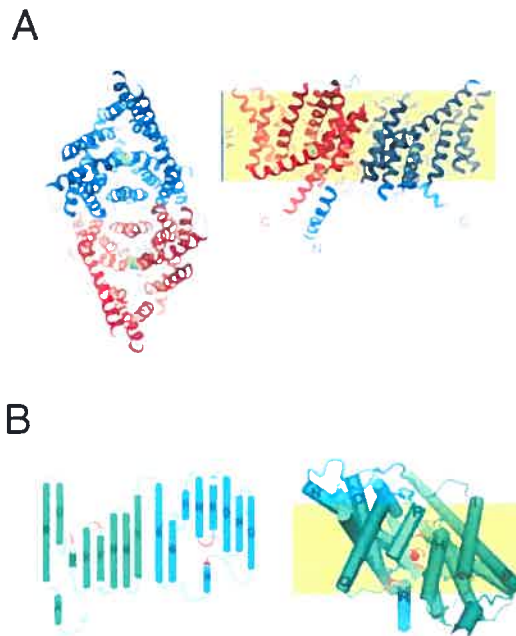


Figure 1.A.4-1 *Structure des ClC*

A. Structure dimérique de StClC du point de vue cytoplasmique (panneau de gauche) et en coupe transversale, soit vue de l'intérieur de la membrane cytoplasmique (panneau de droite). Les deux sous-unités sont en rouge et en bleu. Un ion Cl^- dans le filtre de sélectivité est représenté par une sphère verte. La ligne (35\AA) et la région jaune indiquent l'épaisseur approximative de la membrane et l'insertion proposée de la protéine dans la membrane plasmique. **B.** Structure d'une sous-unité de StClC. Le filtre de sélectivité est représenté en rouge. *Adapté de (Dutzler et al., 2002)*

formation d'hétérodimères. D'ailleurs, la co-expression de différentes classes de ClC mène à un courant Cl^- qui présente des propriétés différentes (Lorenz *et al.*, 1996) des courants de structures homologues. Britton *et al.* (2000) ont à cet égard rapporté une co-localisation de ClC-2 et ClC-3 dans les myocytes cardiaques (Britton *et al.*, 2000).

La séquence de perméabilité relative de ClC-1 à ClC-5 est $\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ (Jentsch *et al.*, 2002; Nilius & Droogmans, 2003). Pour ce qui est de ClC-3, bien qu'une séquence $\text{I}^- > \text{Cl}^-$ ait préalablement été rapportée, il semble que cet artéfact soit dû à une contamination par un courant endogène (Dick *et al.*, 1998; Fahlke *et al.*, 1997; Duan *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Jentsch *et al.*, 2002). Les ClC-K1 et ClC-K2 (homologues murins de ClC-Ka et ClC-Kb, respectivement) font bande à part et présentent une séquence de perméabilité $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$ et $\text{Br}^- > \text{I}^- > \text{Cl}^-$, respectivement (Adachi *et al.*, 1994; Uchida *et al.*, 1998; Waldegger & Jentsch, 2000b).

De façon générale, la conductance unitaire des ClC est très faible, soit de 1-2 pS pour ClC-1 et de 2-5 et 3 pS pour ClC-2 et ClC-4, respectivement (Weinreich & Jentsch, 2001; Lorenz *et al.*, 1996). Le pore d'un proto-canal peut contenir, tout comme CFTR, plus d'un anion à la fois (Pusch *et al.*, 1995; Fahlke, 2001). Par ailleurs, le « gating » des ClC a été étudié en se basant sur ClC-1 et ClC-0 et il semble que la sensibilité du canal au potentiel membranaire soit due à l'anion perméable (Pusch, 1996; Pusch *et al.*, 1995). En se basant sur l'étude de la structure de ClC bactérien et par mutagénèse de ClC-0, Dutzler *et coll.* (2003) ont récemment identifié à cet égard un résidu glutamate situé dans le pore dont la chaîne pourrait jouer un rôle dans l'ouverture et la fermeture du canal tout en expliquant l'effet de l'anion perméant sur la probabilité d'ouverture du canal (Dutzler *et al.*, 2003). De

plus, des travaux récents suggèrent que la dépendance au potentiel de ClC-0 provienne de la liaison d'un ion Cl^- (provenant du milieu extracellulaire) profondément dans le pore du canal à l'état fermé, suite à quoi l'ouverture du pore survient (Chen & Chen, 2003; Chen *et al.*, 2003; Accardi & Pusch, 2003). Il est intéressant de noter toutefois qu'un ClC d'origine procaryote (ClC-ec1, de *Escherichia coli*) ne serait pas un canal mais bien un échangeur Cl^-/H^+ (2 ions Cl^- pour 1 proton) (Accardi & Miller, 2004; Accardi *et al.*, 2004). Il est par contre peu probable que ce soit le cas pour tous les ClC étant donné, entre autres, l'importante différence de conductance unitaire (ClC-ec1 : 0.1 pS et 1-5 pS pour les autres ClC) (Gadsby, 2004; Accardi & Miller, 2004).

ClC-1, -2 et -3 demeurent jusqu'à présent les principaux canaux où la sensibilité aux agents pharmacologiques a été étudiée. Il en ressort que les inhibiteurs de canaux Cl^- modifient les ClC avec différentes affinités, mais aucun inhibiteur n'est vraiment spécifique.

Il existe peu de données sur les effets d'une phosphorylation des ClC. En fait, seuls ClC-1 et ClC-3 sont inhibés par l'activation de la PKC (Rosenbohm *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 1994) alors que le cas de ClC-2 n'est pas clair (Jentsch *et al.*, 2002). D'autre part, l'acidification du milieu extracellulaire inhibe les ClC-Ka, -4 et -5. De plus, le Ca^{2+} , médiateur de nombreuses fonctions majeures est nécessaire à l'activation de ClC-K1 (extracellulaire) mais inhibe ClC-3 (intracellulaire) (Kawasaki *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1999). Notons que l'activation de ClC-Ka et ClC-Kb nécessite une sous-unité β nommée « barttine », une protéine mutée dans une forme

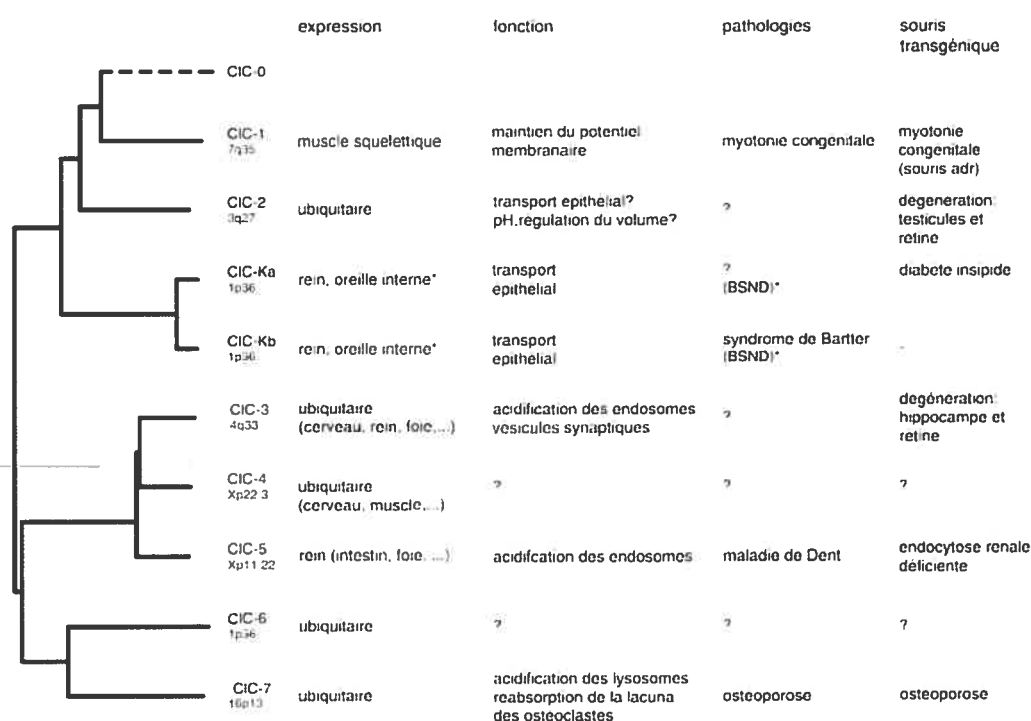


Figure 1.A.4-2 La famille des CIC

Modifié de (Jentsch *et al.*, 2002)

du syndrome de Bartter associée à une surdité congénitale et une défaillance rénale (Birkenhager *et al.*, 2001; Estevez *et al.*, 2001).

L'expression de certains CIC est ubiquitaire (figure 1.A.4-2), alors que d'autres sont restreints au muscle squelettique (CIC-1) ou au rein (CIC-Ka, -Kb et -5) (Jentsch *et al.*, 2002), suggérant ainsi plusieurs fonctions pour ces protéines. Ainsi, CIC-1 est essentiel au maintien du potentiel de repos du muscle squelettique, contribuant pour 70 à 80 % de la conductance membranaire basale d'où la myotonie résultant d'un CIC-1 inopérant (Koch *et al.*, 1992; Steinmeyer *et al.*, 1991; Jentsch *et al.*, 2002; Nilius & Droogmans, 2002). Puisque le Cl^- est distribué passivement dans

le muscle squelettique, ClC-1 inhibe la dépolarisation et stabilise le potentiel membranaire à un niveau négatif mais contribue également à la dépolarisation durant un potentiel d'action.

Il a été suggéré que le courant Cl^- sensible au volume cellulaire (Cl_{vol}) soit la résultante de l'expression de ClC-2 dans certains types cellulaires (Jentsch *et al.*, 2002) ou de ClC-3 (Wang *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2002), bien que des investigations supplémentaires soient nécessaires. D'ailleurs, des souris modifiées génétiquement afin de rendre non fonctionnel ClC-2^{-/-} ou ClC-3^{-/-} présentent tout de même des courants Cl_{vol} . Ces mêmes souris présentent plutôt une dégénérescence rétinienne et une dégénérescence testiculaire (ClC-2) et/ou de l'hippocampe (ClC-3). La localisation de ces protéines dans les vésicules synaptiques et les endosomes suggère plutôt un rôle dans l'acidification des vésicules intracellulaires en fournissant le court-circuit nécessaire à un fonctionnement adéquat de la pompe à proton (Bosl *et al.*, 2001; Stobrawa *et al.*, 2001). Bien qu'il soit possible que des mécanismes compensatoires puissent contrebalancer la perte de ces protéines pour Cl_{vol} , l'existence de tels mécanismes diminue considérablement l'importance de ces candidats pour cette fonction.

Bien qu'un rôle pour ClC-2 ait été avancé pour le maintien de l'action inhibitrice du neurotransmetteur GABA en prévenant d'augmenter la $[\text{Cl}^-]_i$ (puisque ClC-2 est activé par le $[\text{Cl}^-]_i$) (Pusch *et al.*, 1999; Staley *et al.*, 1996), la souris ClC-2^{-/-} ne présente pas le phénotype attendu (Bosl *et al.*, 2001).

Le faible nombre de travaux traitant de ClC-4 et ClC-6 rend difficile de spéculer sur leur rôle si ce n'est que leur localisation subcellulaire est restreinte aux

membranes intracellulaires. Mais une souris $\text{ClC-4}^{-/-}$ ne présente aucun phénotype majeur (Rugarli *et al.*, 1995), ce qui suggérerait que ClC-4 n'aurait soit aucun rôle majeur ou encore pourrait servir de mécanisme compensatoire advenant la perte d'un autre canal tel que ClC-2 , ClC-3 ou même ClC-7 . La colocalisation de ClC-6 avec SERCA2b , la pompe Ca^{2+} -ATPase, suggère que le canal est impliqué dans la dissipation du gradient électrique provoqué par la recapture du Ca^{2+} par le RS (Buyse *et al.*, 1998).

La pathologie de Dent, caractérisée par une protéinurie, une hypercalciurie et une hyperphosphaturie, est associée à des mutations de ClC-5 (Fisher *et al.*, 1994). Tel que démontré avec des souris $\text{ClC-5}^{-/-}$ (Wang *et al.*, 2000; Piwon *et al.*, 2000; Luyckx *et al.*, 1999), la présence de ClC-5 est requise dans les vésicules cytoplasmiques des cellules du tubule proximal afin de permettre aux pompes à protons d'acidifier ces vésicules. Un rôle semblable à celui de ClC-5 a été proposé pour ClC-7 au niveau des ostéoclastes permettant une acidification de la lacuna. D'ailleurs, l'absence de ClC-7 fonctionnel ($\text{ClC-7}^{-/-}$) cause une ostéoporose sévère et une dégénérescence de la rétine (Kornak *et al.*, 2001).

Les ClC-Ka et ClC-Kb nécessitent tous deux la présence d'une sous-unité, la barttine afin d'être actifs. Les souris $\text{ClC-K1}^{-/-}$ souffrent de diabète insipide néphrologique alors que le syndrome de Bartter de type III est associé à des mutations du gène codant pour ClC-Kb (Matsumura *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 1997).

A.5 Canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} (CLCA)

C'est en 1991 que Ran & Benos ont isolé, à partir de cellules endothéliales de trachée de bovin, une protéine qu'ils ont nommé CaCC (pour Ca^{2+} -activated Cl^- Channel) (Ran & Benos, 1991; Ran & Benos, 1992; Cunningham *et al.*, 1995). Cette protéine, lorsque exprimée de façon hétérologue et insérée dans une bicouche lipidique, génère un courant anionique suite à une exposition à de fortes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (2 mM) et/ou suivant une phosphorylation par la protéine kinase dépendante de la calmoduline II (CaMKII) (Cunningham *et al.*, 1995). Le nom provisoire de la protéine vient donc de la nécessité pour le canal d'être phosphorylé par la CaMKII afin de générer un courant et du fait que cette enzyme, tout comme le canal lui-même, requiert une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pour son activation (Cunningham *et al.*, 1995). La découverte subséquente d'autres protéines analogues à CaCC qui forment maintenant la famille des CLCA (Fuller & Benos, 2000a; Fuller & Benos, 2000b; Fuller *et al.*, 2001; Fuller & Benos, 2002; Pauli *et al.*, 2000; Pauli *et al.*, 2002; Gruber *et al.*, 2002; Ho & Shears, 2002; Kidd & Thorn, 2000) a mené à l'implantation d'une nouvelle nomenclature (tableau 1.A.5-1) où CaCC devint bCLCA1 (Gruber *et al.*, 2002). Notons une distinction entre CLCA et Cl_{Ca} . Alors que CLCA exprime une famille de protéines homologues formant pour la plupart un canal anionique, Cl_{Ca} représente plutôt les canaux qui génèrent le courant Cl^- activé par le Ca^{2+} des cellules natives. Jusqu'à présent, différents membres de la famille des CLCA ont été identifiés chez le bovin (2), la souris (4), l'humain (4), le lapin (1) et le porc (1) (Sakai *et al.*, 2001; Fuller & Benos, 2000b; Loewen *et al.*, 2002b; Cunningham *et al.*, 1995; Elble *et al.*, 1997; Gandhi *et al.*, 1998; Romio *et al.*,

1999;Lee *et al.*, 1999;Komiyama *et al.*, 1999;Elble *et al.*, 2002;Gruber *et al.*, 1998a;Agnel *et al.*, 1999;Gruber & Pauli, 1999a;Gaspar *et al.*, 2000). L'absence de séquence s'apparentant aux CLCA dans le génome de la levure suggère que cette famille n'est apparue qu'avec les métazoaires (Agnel *et al.*, 1999).

Les gènes CLCA codent, à l'exception de hCLCA3, pour une protéine d'environ 900 à 945 acides aminés d'un poids moléculaire de 120-130 kDa (Cunningham *et al.*, 1995;Gruber *et al.*, 1998a;Cuppoletti & Malinowska, 1999;Gruber *et al.*, 1999;Elble *et al.*, 1997). Par contre, comme c'est le cas pour la sous-unité α_{1C} de $Ca_{(L)}$ de neurones et de myocytes cardiaques (Gerhardstein *et al.*, 2000;Hell *et al.*, 1996) et pour certaines sous-unités des canaux sodiques épithéliaux (ENaC) (Jovov *et al.*, 2002;Hughey *et al.*, 2003), des processus post-transcriptionnels

Tableau 1.A.5-1 Nomenclature des CLCA

Nom original	Nom de la famille des CLCA	Références
CaCC	bCLCA1	(Cunningham <i>et al.</i> , 1995)
Lu-ECAM-1	bCLCA2	(Elble <i>et al.</i> , 1997)
mCaCC	mCLCA1	(Gandhi <i>et al.</i> , 1998) (Romio <i>et al.</i> , 1999)
mCLCA2	mCLCA2	(Lee <i>et al.</i> , 1999)
Gob-5	mCLCA3	(Komiyama <i>et al.</i> , 1999)
hCLCA1, hCaCC-1	hCLCA1	(Gruber <i>et al.</i> , 1998a) (Agnel <i>et al.</i> , 1999)
hCLCA2, hCaCC-3	hCLCA2	(Gruber <i>et al.</i> , 1999) (Agnel <i>et al.</i> , 1999)
hCLCA3	hCLCA3	(Gruber <i>et al.</i> , 1999)
hCaCC-2	hCLCA4	(Agnel <i>et al.</i> , 1999)
pCLCA1	pCLCA1	(Gaspar <i>et al.</i> , 2000)

Modifié de : (Gruber *et al.*, 2002)

clivent les précurseurs peptidiques en fragments, dans le cas de CLCA, de 90 et de 32/38 kDa (Cunningham *et al.*, 1995; Gruber *et al.*, 1998a; Cuppoletti & Malinowska, 1999; Gruber *et al.*, 1999; Elble *et al.*, 1997). Il a été proposé, malgré l'absence de données définitives, que les fragments s'associent afin de former le canal (Gruber *et al.*, 2002). Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer si cette protéolyse est essentielle à l'activité de CLCA ou si elle potentialise ou inhibe l'activité du canal comme c'est le cas pour ENaC ou l' α_{1C} , respectivement. (Gerhardstein *et al.*, 2000; Hell *et al.*, 1996; Jovov *et al.*, 2002; Hughey *et al.*, 2003)

Aucune donnée sur la structure cristallographique n'étant encore disponible pour un CLCA, la topologie membranaire de ces protéines repose sur l'étude de l'index d'hydrophobicité des acides aminés (analyse Kyte & Doolittle) ainsi que sur des études de mutagenèse dirigée. Or, à l'instar des ClC, les résultats de telles analyses peuvent s'avérer inexacts. Quoiqu'il en soit, il est généralement accepté que les CLCA possèdent quatre domaines transmembranaires et que les sections amino- et carboxy-terminales sont extracellulaires (Gruber *et al.*, 1998a; Fuller & Benos, 2000a; Fuller *et al.*, 2001) à l'exception de hCLCA2 (cinq passages transmembranaires (Gruber *et al.*, 1999)). D'autre part, hCLCA3 et bCLCA2 ne présenteraient qu'un seul passage transmembranaire (Gruber & Pauli, 1999a; Gruber *et al.*, 2002). Une suite de cinq résidus cystéines dans la section N-terminale est retrouvée dans tous les CLCA à l'exception, encore une fois, de hCLCA2. Le rôle des résidus cystéines n'est pas encore très clair (Gruber *et al.*, 2002). Il est suggéré qu'un tel segment pourrait, via des ponts disulfures, être impliqué dans la coordination de la structure et la stabilité d'un complexe multimérique. Ceci pourrait

également expliquer la sensibilité caractéristique des CLCA au dithiothreitol (DTT), un agent réducteur (Gruber *et al.*, 2002). De plus, de nombreux sites de N-glycosylation ont été rapportés.

Une séquence consensus pour la phosphorylation d'un résidu sérine et thréonine par CaMKII et PKC est présente dans la seconde boucle intracellulaire de bCLCA1, bCLCA2, mCLCA1, mCLCA2 et mCLCA4 (Cunningham *et al.*, 1995; Elble *et al.*, 2002; Elble *et al.*, 1997; Gandhi *et al.*, 1998; Fuller & Benos, 2000a; Gruber *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999). Par contre, seul bCLCA1 semble être activé par CaMKII et PKC (Cunningham *et al.*, 1995; Ji *et al.*, 1998). Le résidu sérine, qui peut de plus être potentiellement phosphorylé par PKA, est également conservé chez mCLCA3 bien qu'aucun effet de l'AMPc n'ait été rapporté (Komiya *et al.*, 1999). En ce qui concerne pCLCA1, bien que Loewen *et al.* (2002) ne rapportent aucun effet de l'activation de PKA, PKC ou de l'inhibition de CaMKII (Loewen *et al.*, 2002b), Gaspar *et coll.* (2000) rapportent une stimulation par PKA (Gaspar *et al.*, 2000). Par contre, les homologues humains ne possèdent aucune de ces séquences consensus.

Le tableau 1.A.5-2 résume les données publiées jusqu'à maintenant sur la localisation des différents membres de la famille des CLCA. Notons toutefois que de façon générale (i.e. à l'exception de hCLCA4 et mCLCA4), les CLCA sont exprimés seulement dans les tissus épithéliaux et sécrétoires ainsi que dans l'endothélium vasculaire (Gruber *et al.*, 1998b). L'expression de mCLCA4 semble être restreinte au muscle lisse (Elble *et al.*, 2002).

De nombreuses études laissent entrevoir que les CLCA seraient impliqués dans plusieurs pathologies reliées à des sécrétions épithéliales dysfonctionnelles telles que la mucoviscidose (Fuller & Benos, 2000a) et l'asthme (Nakanishi *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). De plus, des évidences confirment l'implication de certains CLCA dans la formation de métastases en tant que récepteur d'adhésion de cellules cancéreuses à la surface des cellules endothéliales (Abdel-Ghany *et al.*, 2002; Elble *et al.*, 1997; Abdel-Ghany *et al.*, 2001; Pauli *et al.*, 2002; Gruber & Pauli, 1999b; Lee *et al.*, 1999; Gottlieb *et al.*, 1995; Szabo *et al.*, 1998; Konopitzky *et al.*, 2002). Étant donné les propriétés pro-apoptotiques de mCLCA1 et mCLCA2 suggérées par Elble & Pauli (2001) et une expression différentielle de ces protéines selon le stade du développement fœtal murin, un rôle dans le développement a été postulé (Elble & Pauli, 2001; Leverkoehne *et al.*, 2002). Également, puisque hCLCA2 est présent dans l'épithélium de la cornée, Itoh *et coll.* (2000) suggèrent un rôle important dans le maintien de la transparence cornéenne sans toutefois fournir d'évidences (Itoh *et al.*, 2000).

Il est plutôt surprenant de constater le peu d'études biophysiques ou de caractérisations électrophysiologiques réalisées sur les divers CLCA compte tenu qu'ils seraient potentiellement à l'origine des courants Cl_{Ca} ($I_{Cl(Ca)}$) des cellules natives et de leurs rôles dans de nombreuses fonctions cellulaires. Quoiqu'il en soit, bCLCA1 est le mieux caractérisé de tous. Avec une conductance unitaire de 25 pS (Cunningham *et al.*, 1995), les courants enregistrés ne présentent pas de rectification lorsque évalués en conditions de Cl^- symétriques. Par contre, hCLCA1, hCLCA2 et mCLCA1 présentent tous trois une faible rectification sortante (Gruber *et al.*,

1998a; Gruber *et al.*, 1999). De plus, une conductance unitaire inférieure à celle de bCLCA1 (13 pS) a été rapportée pour hCLCA1 (Gruber *et al.*, 1998a).

Contrairement à $I_{Cl(Ca)}$, les courants générés par l'expression des CLCA ne présentent pas ou très peu de cinétiques d'activation ou de désactivation, communément appelées « courants de queue » (« tail currents »), que l'on retrouve dans Cl_{Ca} , même à des potentiels membranaires très élevés. Cette différence notable pourrait être, selon Fuller & Benos (2002), due au fait que les concentrations en Ca^{2+} utilisées pour enregistrer les courants CLCA sont très élevées ($[Ca^{2+}]_i = 5-10 \mu M$ ou $2 mM$) puisque $I_{Cl(Ca)}$ des cellules acinaires lacrymales présentent les mêmes cinétiques lorsque exposées à $2 mM [Ca^{2+}]_i$ (Evans & Marty, 1986; Fuller & Benos, 2002). Greenwood *et coll.* (2002) ont par ailleurs exprimé mCLCA1 dans des cellules HEK293 et enregistré des courants très faibles, si courant il y a, à des $[Ca^{2+}]_i$ de $500 nM$ (Greenwood *et al.*, 2002b). Ces courants ne présentaient aucune cinétique d'activation ni de courants de queue. Par contre, lorsque mCLCA1 est co-exprimé avec la sous-unité β des canaux BK_{Ca} , les courants anioniques présentent, dans près de 30% des cas, des cinétiques d'activation et de désactivation (Greenwood *et al.*, 2002b). Une étude intéressante de Ji *et al.* (1998) a démontré que la délétion des segments amino- et carboxy-terminaux de bCLCA1 induit une légère cinétique d'activation tout en ne modifiant aucunement l'amplitude du courant, la conductance ou la pharmacologie du canal (Ji *et al.*, 1998). Seul pCLCA1 présente des cinétiques d'activation (Loewen *et al.*, 2002b).

Les courants Cl^- enregistrés suite à une transfection hétérologue d'un CLCA sont généralement induits par l'exposition de la cellule à un ionophore calcique,

l'ionomycine, et une forte $[Ca^{2+}]$ (≈ 2 mM). Jusqu'à présent, aucune étude n'a été réalisée ayant pour but d'établir une courbe dose-réponse d'un CLCA pour la $[Ca^{2+}]_i$. Contrairement à ce qui avait été précédemment rapporté (Cunningham *et al.*, 1995), la phosphorylation par CaMKII ne semble pas nécessaire à l'activation de bCLCA1 (Ho *et al.*, 2001). En fait, selon Fuller & Benos (2002), la phosphorylation par CaMKII ne ferait qu'abaisser l' EC_{50} pour le Ca^{2+} (Fuller & Benos, 2002).

Les CLCA possèdent une pharmacologie distincte des autres canaux Cl^- . Le premier membre à être identifié, bCLCA1, est insensible à l'acide niflumique (ANF) (Cunningham *et al.*, 1995), pourtant le plus puissant inhibiteur de $I_{Cl(Ca)}$, ce qui n'est toutefois pas le cas de tous les CLCA (tableau 1.A.5-3). Par contre, pratiquement tous les CLCA sont inhibés par le DTT. Cette sensibilité à l'agent réducteur est attribuée à un regroupement de résidus cystéines à la portion extracellulaire amino-terminale et pourrait être reliée à la structure quaternaire de la protéine. Une liste des effets d'autres inhibiteurs classiques des canaux Cl^- est présentée au tableau 1.A.5-3. Notons que le DIDS inhibe pratiquement tous les courants générés par l'expression des CLCA. Un cas intéressant est celui du D-myo-inositol 3,4,5,6 tetrakisphosphate (Ins(3, 4, 5, 6)- P_4). Métabolite physiologique de l' IP_3 , cet inhibiteur pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'activité des CLCA (rétroaction négative) (Ho & Shears, 2002; Ismailov *et al.*, 1996; Ho *et al.*, 2001). De plus, l'action du métabolite sur bCLCA1 semble varier selon la $[Ca^{2+}]_i$ (Ho & Shears, 2002).

Tableau 1.A.5-2 Localisation tissulaire des CLCA

CLCA	Épithélium				Endothélium			Utérus, Prostate, Épididyme, Testicules	Rein	Cerveau
	Trachée	Bronche	Respiratoire	Intestin	Mammaire	Aorte	Pulmonaire	Veine splénique		
bCLCA1	X	X								
bCLCA2						X	X	X		
hCLCA1			X	X					X	X
hCLCA2					X	X	X		X	
hCLCA3			X							
hCLCA4				X	X	X	X		X	X
mCLCA1				X	X	X	X		X	
mCLCA2										
mCLCA3				X					X	

X : Présence de la protéine dans le tissu

Tableau 1.A.5-3 Inhibiteurs des CLCA

CLCA	DIDS	SITS	ANF	DTT	NPPB	InsP ₄	Tamoxifène	A-9-C	α -Phényl-cinnamate
bCLCA1	•		Ø	•	•	•			
hCLCA1	•		•	•					
hCLCA2	•		•	•			•		
mCLCA1	•		•						
mCLCA3			•						
pCLCA1	Ø	Ø		Ø	•			Ø	•

DIDS : « 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid »; **SITS** : « 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid »; **ANF** : Acide niflumique; **DTT** : Dithiothréitol; **NPPB** : « 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid »; **InsP₄** : D-myo-inositol 3,4,5,6 tetrakisphosphate; **A-9-C** : « anthracene-9-carboxylic acid »;

Les symboles (•) expriment la sensibilité de la protéine à l'inhibiteur et le symbole (Ø) signifie que le composé n'a aucun effet sur la protéine.

A.6 Bestrophines

La dystrophie maculaire vitelliforme (DMV) ou pathologie de Best est une dégénérescence de la macula caractérisée par une accumulation de lipofuscine sous l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Sun *et al.*, 2002; Bakall *et al.*, 1999). Cette altération héréditaire de la vision est associée à des mutations (plus de 80) (Bakall *et al.*, 2003) du gène codant pour la bestrophine pour lequel on retrouve plusieurs homologues de l'insecte à l'humain (Qu *et al.*, 2003; Bakall *et al.*, 2003; Tsunenari *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002; Stohr *et al.*, 2002). La topologie de cette protéine de 585 acides aminés (68 kDa) fait l'objet de spéculations divergentes avec 4, 5 ou 6 segments transmembranaires et un long domaine carboxy-terminal intra- ou extracellulaire (Qu *et al.*, 2003; Tsunenari *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002; White *et al.*, 2000). La bestrophine est exprimée à la membrane basolatérale des EPR (Marmorstein *et al.*, 2000; Bakall *et al.*, 2003) mais également à la membrane plasmique des oocytes (Qu *et al.*, 2003).

Une étude de Sun *et al.* (2002) a rapporté l'expression hétérologue de plusieurs bestrophines. Ces données ont permis d'obtenir des informations supplémentaires sur la fonction de cette protéine dans la DMV (Sun *et al.*, 2002). Selon les auteurs de l'étude, plusieurs sous-unités (quatre ou cinq) s'associent pour former des canaux Cl^- sensibles à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et la mutation d'une sous-unité serait suffisante pour rendre le canal inopérant, ce qui expliquerait la dominance négative de la pathologie (Sun *et al.*, 2002). Quoiqu'il en soit, les bestrophines peuvent s'associer pour former des homomultimères ou des hétéromultimères (Sun *et al.*,

2002). Avec un K_d pour le Ca^{2+} de 210 nM, xBest (chez *Xenopus*) est le premier canal Cl^- à être activé par des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ physiologiques. Bien que cette sensibilité ne corresponde pas exactement à celle des canaux natifs, elle est plus que près que celle des CLCA.

Alors que la séquence de perméabilité des bestrophines est $\text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ et qu'elles ne présentent pratiquement aucune cinétique d'activation ou de déactivation (Sun *et al.*, 2002; Qu *et al.*, 2003), les différents homologues semblent avoir des relations courant-voltage (*IV*) très distinctes (Sun *et al.*, 2002; Tsunenari *et al.*, 2003). Le courant généré par l'expression de hBest1 (chez l'humain) est sensible au DIDS, un inhibiteur classique des canaux Cl^- et ce, de façon réversible (Sun *et al.*, 2002).

De plus, la perte irréversible du courant (« rundown ») est observée lorsque la technique de patch clamp en configuration « cellule entière » est utilisée (Sun *et al.*, 2002). Ceci suggère qu'un élément essentiel à l'activité de ces canaux, la phosphorylation du canal ou d'une protéine régulatrice telle qu'une kinase par exemple, est perdu lors de la dialyse de la cellule. D'ailleurs, pBest (chez le porc) a été isolé à l'état phosphorylé et est colocalisé avec la protéine sérine/thréonine phosphatase PP2A qui, par ailleurs, est impliquée dans la déphosphorylation du canal (Marmorstein *et al.*, 2002). De multiples séquences consensus pour la phosphorylation par la PKA, « Caseine Kinase » et PKC ont été identifiées chez xBest (Qu *et al.*, 2003).

Section B : Canaux Cl⁻ endogènes

La concentration intracellulaire des ions Cl⁻ des CML est nettement supérieure à celle prédite pour une distribution passive des ions de part et d'autre de la membrane plasmique, contrairement au muscle squelettique où le Cl⁻ est généralement considéré comme étant à l'équilibre au PM (Chipperfield & Harper, 2000). Ce gradient dans le muscle lisse provient de l'action d'échangeurs à la membrane. Ceci a pour effet de créer un gradient chimique et donc un potentiel d'inversion des ions Cl⁻ (E_{Cl}) plus positif (≈ -20 à -30 mV) (Aickin & Brading, 1982; Chipperfield & Harper, 2000) que le potentiel membranaire basal (entre -45 et -60 mV) (Nelson *et al.*, 1990; Kuriyama *et al.*, 1995). Par conséquent, l'ouverture de canaux perméables aux Cl⁻ causera une dépolarisation tendant vers E_{Cl} . Puisque l'ouverture des canaux Ca_(L) impliqués dans la contraction dépend du PM, les canaux Cl⁻ peuvent potentiellement induire la contraction des CML.

Deux principaux types de courants Cl⁻ ont été observés dans les CML vasculaires, soit le courant Cl⁻ sensible aux changements du volume cellulaire (Cl_{vol}) et le courant Cl⁻ activé par le Ca²⁺ (I_{Cl(Ca)}). L'identité moléculaire des canaux qui génèrent ces courants n'est malheureusement pas encore définie. Plusieurs candidats sont en liste, mais jusqu'à présent, aucun de ceux-ci ne s'est avéré correspondre suffisamment au phénotype observé dans les cellules natives. Les courants endogènes observés seront donc traités en relation avec les différents candidats proposés.

B.1 Canaux Cl^- sensibles au volume (Cl_{vol})

Le maintien de l'équilibre homéostatique et, par conséquent, du volume cellulaire est une fonction vitale pour tous les types de cellules. Les cellules animales ne possèdent pas de parois rigides et doivent donc recourir à divers mécanismes afin de maintenir un volume cellulaire relativement stable. Ces mécanismes sont les mécanismes de diminution régulatrice du volume (DRV) et d'augmentation régulatrice du volume (ARV) cellulaire (Furst *et al.*, 2002; Nilius & Droogmans, 2003; Jentsch *et al.*, 2002). Le DRV permet à la cellule de pallier à une augmentation ou une diminution de volume provoquée par des changements d'osmolarité extracellulaire/intracellulaire. Le DRV se traduit par une diminution de la concentration intracellulaire d'ions K^+ et Cl^- afin de maintenir l'électroneutralité du système. L'efflux de molécules d'eau ainsi induit permet le retour au volume cellulaire basal. L'identité de la protéine ou des protéines responsables d'un tel efflux d'ions Cl^- reste à confirmer. Puisque Cl_{vol} des CML s'apparente fortement aux Cl_{vol} d'autres types cellulaires, cette section traitera des Cl_{vol} en général.

B.1.1 Propriétés de Cl_{vol}

Bien que le stimulus majeur pour l'activation de Cl_{vol} soit l'augmentation du volume cellulaire, le courant peut également être généré suite à l'étirement de la membrane plasmique ou encore à une réduction de la force ionique intracellulaire

(Dick *et al.*, 1998;Furst *et al.*, 2002;Nilius *et al.*, 1998;Voets *et al.*, 1999;Zhang & Jacob, 1997). Il a été démontré qu'une phosphorylation par la PKC inhibe Cl_{vol} dans certains types cellulaires (Furst *et al.*, 2002;Duan *et al.*, 1997;Duan *et al.*, 1999;Duan *et al.*, 2001;Coca-Prados *et al.*, 1996). D'ailleurs, Duan *et al.* (1999) ont suggéré que l'augmentation du volume de la cellule diminue la phosphorylation du canal par la dilution ou la redistribution cellulaire de l'enzyme, ce qui préviendrait l'inhibition constante de Cl_{vol} à l'état basal (Duan *et al.*, 1999). Dans d'autres types cellulaires par contre, une phosphorylation par la PKC ou une tyrosine kinase peut activer Cl_{vol} (Furst *et al.*, 2002). Notons que la présence d'ATP est nécessaire à l'activation de Cl_{vol} , sans pour autant que l'ATP soit hydrolysé (Nilius & Droogmans, 2003;Jackson *et al.*, 1994). La dépendance de Cl_{vol} pour le $[Ca^{2+}]_i$ demeure encore obscure, certains rapportant qu'une augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ soit nécessaire à Cl_{vol} alors que d'autres prétendent le contraire (Jentsch *et al.*, 2002;Furst *et al.*, 2002). D'autre part, il est bien évident que le cytosquelette est un important modulateur de l'activité de Cl_{vol} ce qui expliquerait ainsi l'activation du courant par l'étirement de la cellule (Nilius & Droogmans, 2003).

Les courants enregistrés suite à l'activation de Cl_{vol} présentent généralement une conductance unitaire de 20 à 40 pS (Furst *et al.*, 2002;Strange *et al.*, 1996). Mis à part la sensibilité au volume, Cl_{vol} est caractérisé par des cinétiques particulières d'activation et d'inactivation dépendantes du potentiel membranaire (figure 1.B.1-1) (Strange *et al.*, 1996). Tout comme pour les CIC, il semble que la dépendance au voltage de Cl_{vol} soit affectée par la nature de l'anion perméant ainsi que par les concentrations de l'anion de part et d'autre de la membrane (Jentsch *et al.*,

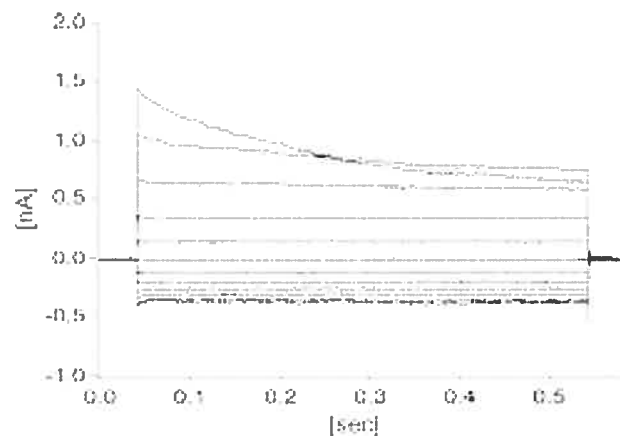


Figure 1.B.1-1 Tracé représentatif de Cl_{vol}

Courant activé par le volume enregistré dans une cellule fibroblastique NIH 3T3 exposée à un milieu hypotonique. Avec un potentiel de maintien à 0 mV, le fibroblaste fut soumis à une série de potentiels entre -120 et +100 mV par sauts de +20 mV. Notons l'inactivation relativement lente du courant à +100 mV. Tiré de (Furst *et al.*, 2002)

2002;Nilius & Droogmans, 2003;Voets *et al.*, 1997). D'ailleurs, la séquence de perméabilité rapportée pour Cl_{vol} est $SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > F^-$ (Nilius & Droogmans, 2003;Furst *et al.*, 2002).

Du point de vue pharmacologique, malgré une sensibilité au DIDS, SITS, A-9-C et au NPPB de l'ordre du micromolaire (Nilius & Droogmans, 2003;Furst *et al.*, 2002;Nilius, 2001), l'absence d'inhibiteurs spécifiques pour Cl_{vol} est marquante (voir Tableau 3 de (Furst *et al.*, 2002)) sans compter que l'ANF ne semble avoir aucun effet sur Cl_{vol} dans la plupart des préparations (Hoffmann, 2000;Greenwood & Large, 1998). Notons toutefois que le tamoxifène, un anti-estrogène, est l'agent pharmacologique le plus sélectif pour Cl_{vol} (Hoffmann, 2000).

B.1.2 Candidats moléculaires possibles pour Cl_{vol}

Les candidats déçus : Plusieurs protéines ont été suggérées comme représentants moléculaires de Cl_{vol} telles que la P-glycoprotéine, $pI_{Cl_{in}}$, phospholemman, AE1 (« Anion Exchanger 1 ») et VDAC (« Voltage-Dependent Anion Channel »), mais ces protéines n'ont pas résisté aux nombreuses études exhaustives sur Cl_{vol} (Valverde *et al.*, 1992; Morin *et al.*, 1995; Rasola *et al.*, 1994; Vanoye *et al.*, 1997; De Greef *et al.*, 1995b; De Greef *et al.*, 1995a; Paulmichl *et al.*, 1992; Musch *et al.*, 1998; Schwartz *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1998; Furst *et al.*, 2002). Toutefois, tant pour la P-glycoprotéine que pour $pI_{Cl_{in}}$, il est fort possible que ces protéines soient des protéines régulatrices de Cl_{vol} sans pour autant encoder pour une protéine-canal (Strange *et al.*, 1996; Clapham, 1998).

CIC-2 : C'est en 1992 que Grunder *et coll.* (1992) ont démontré que ce membre de la famille des CIC pouvait être activé par le gonflement cellulaire (Grunder *et al.*, 1992), ce qui fut confirmé par expression hétérologue (Furukawa *et al.*, 1998; Xiong *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 2001). Par contre, une faible conductance unitaire (3-5 pS), une séquence de perméabilité différente ($Cl^- > Br^- > I^-$), l'absence de rectification et une inactivation à des potentiels négatifs portent à croire que CIC-2 ne code pas pour la protéine tant souhaitée (Furst *et al.*, 2002). De plus, des souris pour lesquelles CIC-2 a été rendu inopérant présentent tout de même des courants Cl_{vol} (Nehrke *et al.*, 2002).

ClC-3 : Duan *et coll.* (1997) ont suggéré pour la première fois en 1997 que cet autre membre des ClC était le Cl_{vol} , car il était activé par l'hypertonie et inhibé par le tamoxifène, présentait une sélectivité anionique ($I^- > Cl^-$), avec une conductance unitaire (40 pS) et montrait une inactivation au potentiel membranaire semblable à Cl_{vol} (Duan *et al.*, 1997). De plus, une phosphorylation de ClC-3 par la PKC pourrait inhiber Cl_{vol} puisque l'ablation du site consensus pour la PKC induit l'expression d'un canal constitutivement actif (Duan *et al.*, 1999). Toutefois, des souris transgéniques knock-out pour ClC-3 présentent tout de même un courant Cl_{vol} (Stobrawa *et al.*, 2001). Plusieurs études ont démontré que ClC-3 se retrouve au niveau des organelles intracellulaires, limitant ainsi la probabilité qu'il soit impliqué dans le DRV (voir :Jentsch *et al.*, 2002).

Quoiqu'il en soit, le débat au sujet de l'identité moléculaire de Cl_{vol} est toujours ouvert. Une difficulté majeure dans ce domaine de recherche est le fait que vraisemblablement toutes les cellules possèdent des mécanismes de DRV. Par conséquent, il est difficile de démontrer hors de tout doute que l'expression d'une protéine est responsable de Cl_{vol} . De plus, la modification du bagage génétique d'une souris peut également induire l'activation de mécanismes compensatoires pour la perte d'un gène important pour Cl_{vol} .

B.2 Canaux Cl⁻ activés par le Ca^{2+} (Cl_{Ca}) endogènes

Les courants générés par les canaux anioniques activés par le Ca^{2+} (Cl_{Ca}) présents dans les cellules natives de différents tissus démontrent généralement

beaucoup de similitudes et peu de différences importantes (Machaca *et al.*, 2002). C'est donc pour cette raison que la présente section traitera des courants Cl_{Ca} ($I_{Cl(Ca)}$) de différents types cellulaires (oocytes de *Xenopus*, cellules acinaires, endothéliales, etc.) de même que des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, d'excellents articles de revue sur les $I_{Cl(Ca)}$ sont disponibles (Nilius & Droogmans, 2003; Large & Wang, 1996; Large *et al.*, 2002; Kidd & Thorn, 2000; Machaca *et al.*, 2002; Nilius & Droogmans, 2002; Morris, 1999; Frings *et al.*, 2000).

B.2.1 Approches expérimentales utilisées pour étudier les Cl_{Ca}

L'activité des canaux Cl_{Ca} peut être étudiée à l'aide de plusieurs techniques différentes mais ayant toutes en commun une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$. En canal unitaire, l'excision du patch et l'exposition du côté interne de la membrane à une forte concentration en Ca^{2+} (entre 200 nM et 2 mM $[Ca^{2+}]_i$) peut mener à une activation des canaux (Hirakawa *et al.*, 1999; Large & Wang, 1996; Piper & Large, 2003). Malheureusement, cette technique cause une perte irréversible de l'activité des canaux (« rundown »), probablement causée par la perte d'un élément cytoplasmique essentiel à l'activité du canal.

Les STICs : En conditions physiologiques, certains types cellulaires libèrent de façon spontanée et très localisée une grande quantité de Ca^{2+} contenue dans le RS (étincelle calcique ou « Ca^{2+} sparks »). Cette augmentation transitoire de la $[Ca^{2+}]_i$, souvent près de la membrane, active des canaux sensibles au Ca^{2+} tels que BK_{Ca} et Cl_{Ca} . L'activation de Cl_{Ca} induit un courant entrant nommé STICs (« Spontaneous Transient Inward Currents ») (figure 1.B.2-1A) (Greenwood *et al.*, 1997). Bien que

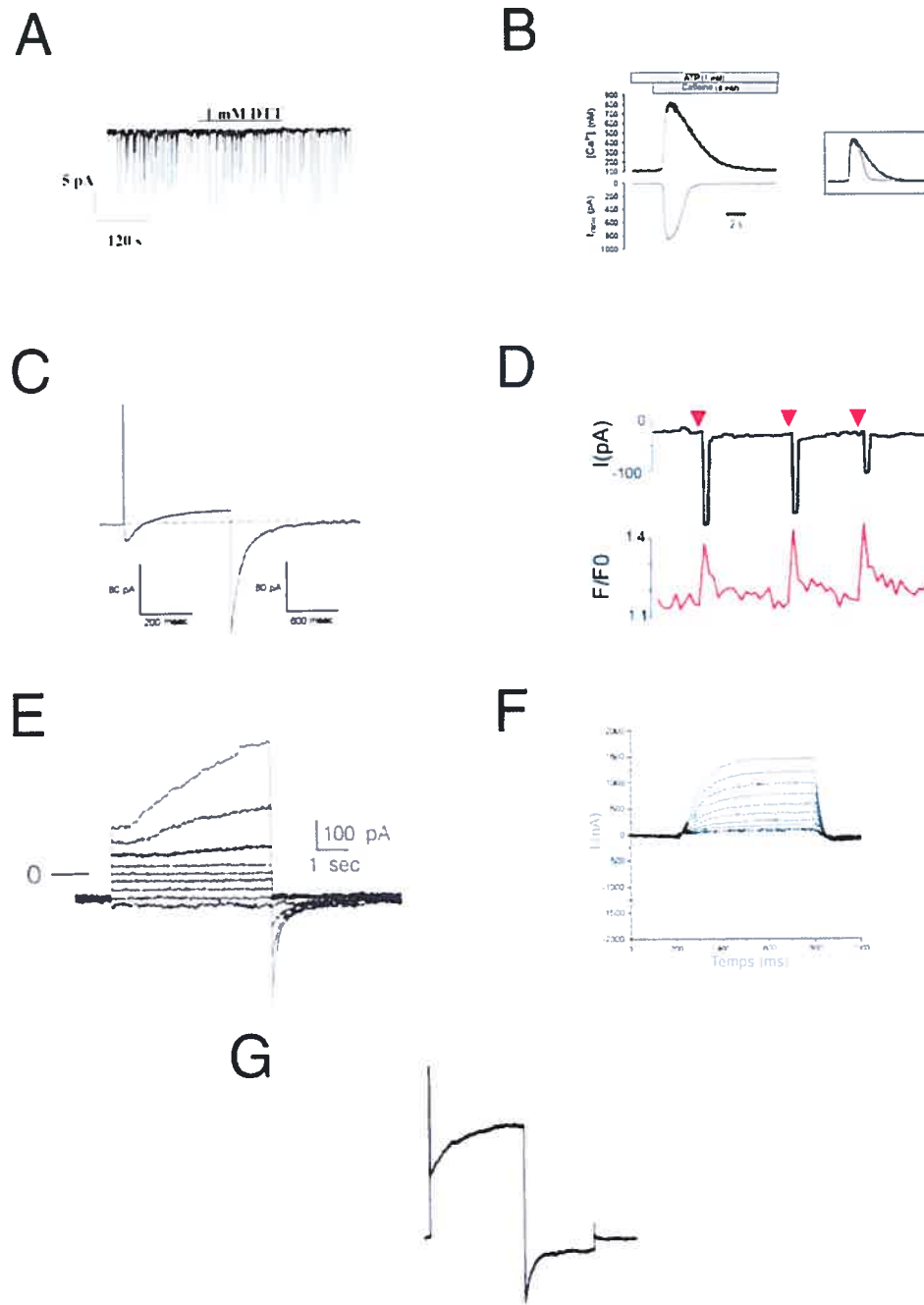


Figure 1.B.2-1 *Illustration des approches expérimentales utilisées pour étudier Cl_{Ca}*

A. STICs d'un myocyte de la veine porte où le dithiothréitol (DTT) fut utilisé pour évaluer la sensibilité de Cl_{Ca} aux agents oxydants (Greenwood *et al.*, 1997). **B.** $I_{Cl(Ca)}$ est induit par une exposition à la caféine dans une cellule musculaire lisse de la trachée (Wang & Kotlikoff, 1997a). **C.** $I_{Cl(Ca)}$ est induit par l'influx calcique via l'ouverture des canaux Ca_L (Lamb *et al.*, 1994). **D.** Libération de Ca^{2+} par une source lumineuse intense qui active Cl_{Ca} (Park *et al.*, 2001). **E.** $I_{Cl(Ca)}$ est activé par la pompe Na^+/Ca^{2+} en mode inverse (Leblanc & Leung, 1995). **F.** Activation de $I_{Cl(Ca)}$ par l'exposition à l'ionomycine, un ionophore Ca^{2+} (Chan *et al.*, 2000a). **G.** Courant Cl_{Ca} induit par la dialyse d'une solution avec une $[Ca^{2+}]_i$ fixe (Greenwood *et al.*, 2002a).

ces enregistrements soient obtenus dans des conditions plus « physiologiques » (c.-à-d. sans altération du milieu intracellulaire), ce type d'activité autonome n'est malheureusement pas présent dans tous les types cellulaires.

Les agonistes: On peut également provoquer la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS par l'exposition de la cellule à des agents tels que la caféine ou la norépinéphrine (NE) (figure 1.B.2-1B) (Wang & Kotlikoff, 1997a). Cette approche permet aussi de voir l'impact de certains agonistes physiologiques sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$.

Canaux calciques : Cette méthode implique l'ouverture de canaux $\text{Ca}_{(\text{L})}$ qui permet ainsi un influx calcique qui active Cl_{Ca} (figure 1.B.2-1C) (Lamb *et al.*, 1994). On peut observer le courant $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ en dépolarisant la membrane, ce qui stimule l'ouverture de $\text{Ca}_{(\text{L})}$ et l'activation subséquente de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ peut être enregistrée en repolarisant la membrane. Cette technique permet d'étudier Cl_{Ca} de façon transitoire et sa relation avec $\text{Ca}_{(\text{L})}$.

« Ca^{2+} -uncaging » : Cette technique utilise du Ca^{2+} « emprisonné » (« caged ») dans une molécule (nitro-phenyl-EGTA; NP-EGTA) qui est dialysée dans le cytoplasme de la cellule (Park *et al.*, 2001). À l'aide d'une source lumineuse intense (faisceau monochromatique provenant d'un laser ou lumière émise par une lampe halogène ou au mercure), les molécules sont excitées et libèrent le Ca^{2+} cagé (« uncaged ») qu'elles contiennent (figure 1.B.2-1D). Cette technique a pour principal avantage une libération de Ca^{2+} très localisée et bien contrôlée (espace et temps).

Échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$: Une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ provoque un changement de l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ à la membrane

plasmique qui fonctionne alors en mode « inverse » (« reverse-mode ») (Leblanc & Leung, 1995). L'accumulation de Ca^{2+} cytoplasmique qui en résulte peut mener à l'activation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ tel qu'il a été étudié par Leblanc & Leung (1995) (figure 1.B.2-1E) (Leblanc & Leung, 1995). Cette augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ varie peu en fonction du temps, ce qui permet d'étudier différentes propriétés de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ dont les cinétiques d'activation sans variation majeure de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Les techniques précédentes, bien que très attrayantes sur plusieurs aspects, présentent un désavantage commun soit celui que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, souvent transitoire, est inconnue. Par contre, d'autres techniques permettent d'élever la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de façon stable et à une valeur connue, l'ionophore calcique et le « Ca^{2+} -clamp ».

Ionophore calcique: L'exposition de la cellule à un ionophore calcique (A23187 ou ionomycine) permet la formation de systèmes de transport sélectifs au Ca^{2+} dans la membrane plasmique. Par conséquent, la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ viendra à l'équilibre avec $[\text{Ca}^{2+}]_e$, permettant de maintenir une concentration intracellulaire en Ca^{2+} relativement stable (figure 1.B.2-1F) (Chan *et al.*, 2000a). De plus, cette technique est généralement utilisée de concert avec le patch perforé, ce qui limite l'altération du milieu intracellulaire. Par contre, des variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peuvent survenir et, par le fait même, affecter l'amplitude du courant macroscopique enregistré.

Ca^{2+} -clamp: Cette technique nécessite l'utilisation du patch en mode conventionnel cellule entière, ce qui permet la dialyse de la solution de pipette dans le cytoplasme de la cellule. Cette solution interne contient en forte concentration (10 mM) un chélateur calcique (BAPTA ou EGTA) ainsi que des quantités de CaCl_2 suggérées par un logiciel afin d'obtenir des concentrations fixes de Ca^{2+} libre dans la

solution et par conséquent dans le cytoplasme (figure 1.B.2-1G) (Greenwood *et al.*, 2002a). La concentration élevée de chélateur assure un fort pouvoir de tampon à la solution, ce qui limite les variations globales et réduit considérablement les variations locales (sous-membranaires) de $[Ca^{2+}]_i$.

B.2.2 Structure de Cl_{Ca}

Puisque l'identité moléculaire du gène codant pour Cl_{Ca} n'est pas encore résolue, très peu de données sont disponibles sur la structure du canal. En fait, les seules données disponibles concernent les dimensions intérieures du pore de Cl_{Ca} d'oocytes de *Xenopus Laevis* obtenues à partir de la différence de perméabilité pour des ions de différentes tailles ainsi que l'effet de différents inhibiteurs de Cl_{Ca} (Qu & Hartzell, 2001). Qu & Hartzell suggèrent que chez l'oocyte, le pore de Cl_{Ca} aurait la forme d'un cône elliptique avec la plus grande ouverture faisant face au milieu extracellulaire (Qu & Hartzell, 2001). Les auteurs suggèrent que la portion la plus étroite du pore (plus intracellulaire) mesure entre $3.3 \times 7.5 \text{ \AA}$ et $4.6 \times 9.4 \text{ \AA}$ alors que la bouche externe serait de l'ordre de $6.0 \times 9.4 \text{ \AA}$. Quoiqu'il en soit, des études cristallographiques sur la protéine isolée Cl_{Ca} seront nécessaires afin de confirmer ces données.

B.2.3 Propriétés Biophysiques des Cl_{Ca}

Étant donné la faible conductance unitaire des Cl_{Ca} (1-3 pS) dans la plupart des tissus, peu d'études en canal unitaire ont été réalisées jusqu'à présent. Par

conséquent, les données disponibles sur les propriétés biophysiques de ces canaux sont généralement basées sur les courants macroscopiques (Piper & Large, 2003; Hirakawa *et al.*, 1999; Klockner, 1993; Van Renterghem & Lazdunski, 1993; Sun *et al.*, 1993; Nilius & Droogmans, 2003). Notons cependant qu'Arreola *et al.* (1996) ont rapporté que les Cl_{Ca} des cellules acinaires de rat présentent une conductance de 30 pS (Arreola *et al.*, 1996). De plus, deux types de conductance ont été rapportées au niveau des neurones (Frings *et al.*, 2000). Récemment, Piper et Large (2003) ont présenté une étude exhaustive en canal unitaire sur les $I_{Cl(Ca)}$ de l'artère pulmonaire de lapin (Piper & Large, 2003). Ils ont démontré l'existence de trois niveaux de sous-conductance de 1.2, 1.8 et 3.5 pS pour un même canal. L'état conducteur du canal dépendrait de la $[Ca^{2+}]_i$ et varierait de façon inversement proportionnelle à celle-ci. À de fortes $[Ca^{2+}]_i$ (1 μ M), le canal présenterait généralement une conductance de 1.2 ou 1.8 pS alors qu'à de très faibles $[Ca^{2+}]_i$ (50 nM), le niveau de conductance de 3.5 pS serait le plus fréquent. Bref, $I_{Cl(Ca)}$ est un courant de faible amplitude absolue. Par contre, la résistance d'entrée très élevée que l'on retrouve dans les CML suggère que même un faible courant (comme par exemple, $I_{Cl(Ca)}$) peut avoir un impact majeur sur le PM des myocytes. De plus, le nombre de canaux Cl_{Ca} présents à la membrane des CML a été estimé entre 500 et 10000 (Large & Wang, 1996).

Les courants $I_{Cl(Ca)}$ macroscopiques endogènes présentent des cinétiques d'activation et de désactivation caractéristiques qui montrent une dépendance temporelle, ce qu'on ne retrouve pas dans tous les types de canaux tels que CFTR et les CLCA. Lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ est maintenue stable (Ca^{2+} -clamp, ionophore calcique ou échangeur Na^+/Ca^{2+} en « mode inverse »), on observe une cinétique lente

d'activation à des potentiels positifs due à une augmentation du courant macroscopique en fonction du temps (figure 1.B.2-1E, F et G). Ceci diffère nettement de ce qui est observé pour d'autres canaux Cl^- . Par exemple, ClC-0 , -1 et -2 ne présentent aucune cinétique d'activation à des potentiels positifs mais une déactivation (ClC-0 et ClC-1) ou une activation (ClC-2) à des potentiels négatifs (Fahlke, 2001), alors que CFTR et les CLCA ne présentent aucune cinétique (Zhang *et al.*, 2000; Britton *et al.*, 2002). D'autre part, la déactivation de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ est également fonction du temps, la fermeture des canaux étant relativement lente lors d'un retour à des potentiels négatifs suivant une dépolarisation. Ceci suggère que les cinétiques des courants macroscopiques ne sont pas uniquement causées par des changements de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puisque ces cinétiques sont également observées lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est fixe.

Les canaux Cl_{Ca} présentent une forte dépendance de la probabilité d'ouverture au potentiel membranaire (Large & Wang, 1996; Piper & Large, 2003). Par contre, puisque les cinétiques d'activation (τ_{act}) de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ de *Xenopus* et de CML (voir (Large *et al.*, 2002)) ne varient pas en fonction du potentiel, Kuruma & Hartzell (2000) ont suggéré que l'ouverture du canal n'est pas dépendante du potentiel membranaire (Kuruma & Hartzell, 2000). En présence de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ faibles ou même relativement élevées ($< 2 \mu\text{M}$), $I_{\text{Cl(Ca)}}$ est généralement caractérisé par une forte rectification sortante du courant en régime établi induit par une dépolarisation et une forte rectification du « courant de queue » enregistré lors de la repolarisation. (Arreola *et al.*, 1996; Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000; Nilius & Droogmans, 2002; Pedersen *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003). Par contre, la rectification est faible, voir même absente, pour le courant instantané induit par la même dépolarisation. La

courbe *IV* devient plus linéaire à mesure que la $[Ca^{2+}]_i$ est augmentée sans qu'il n'y ait pour autant de modification de la conductance maximale (g_{max}) (Arreola *et al.*, 1996; Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000). Il est important de noter que certains ont rapporté l'absence d'une rectification pour $I_{Cl(Ca)}$ sans pour autant préciser la $[Ca^{2+}]_i$ utilisée (Klockner, 1993). Or, une forte $[Ca^{2+}]_i$ pourrait expliquer cette discordance. D'autre part, $I_{Cl(Ca)}$ des cellules endothéliales présente une activation et une désactivation plus lente à des potentiels plus positifs (Nilius & Droogmans, 2002). Les cinétiques de $I_{Cl(Ca)}$ sont également influencées par la liaison de l'anion perméant à un site externe comme pour les ClC-0 et ClC-1, bien que la présence de Cl^- externe ne soit pas nécessaire à l'activation de Cl_{Ca} (Large *et al.*, 2002)

Selon Piper & Large (2003), le temps d'ouverture moyen de Cl_{Ca} des myocytes d'artères pulmonaires est indépendant du potentiel membranaire et de la $[Ca^{2+}]_i$, alors que le temps de fermeture n'est pas influencé par la $[Ca^{2+}]_i$ (Piper & Large, 2003). De plus, selon cette même étude, la liaison du Ca^{2+} au canal serait augmentée ou facilitée par une dépolarisation (Piper & Large, 2003). Les auteurs affirment également qu'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (ou une dépolarisation qui faciliterait la liaison du Ca^{2+}) diminuerait la conductance unitaire du canal. Par conséquent, selon cette étude, la probabilité d'ouverture étant indépendante de la $[Ca^{2+}]_i$, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ devrait ultimement réduire le courant macroscopique. Or, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induit une augmentation du courant macroscopique de Cl_{Ca} .

La séquence de perméabilité de $I_{Cl(Ca)}$ est semblable à celle de CFTR, GlyR et GABA_AR. En bref, cette séquence lyotropique, $I^- > Br^- > Cl^-$ (Winpenny *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2003; Machaca *et al.*, 2002; Kuruma & Hartzell, 2000; Qu & Hartzell, 2000; Lamb & Barna, 1998a; Ullrich & Sontheimer, 1996; Nilius & Droogmans, 2002) est une séquence Eisenman de type I révélant ainsi un champ énergétique de faible intensité qui peut être adjacent à des régions hydrophobiques et est donc déterminée par l'énergie d'hydratation ionique bien que d'autres facteurs y contribuent également (Hille, 1992). De plus, certains anions perméants inhibent le canal de façon voltage-dépendante, ce qui donne l'apparence que le canal est moins perméable à ces anions (Machaca *et al.*, 2002). En effet, l'affinité du site de sélectivité pour certains anions est si grande que ces derniers restent liés au filtre de sélectivité plus longtemps, d'où l'obstruction du pore par l'ion perméant. Également, la déactivation de Cl_{Ca} est ralentie par la présence d'anions plus perméants que le Cl^- , comme par exemple l' I^- , phénomène du « pied-dans-la-porte » (« foot-in-the-door ») (Greenwood & Large, 1999). En fait, l'anion perméable stabilise le canal dans l'état ouvert ce qui suggère que le « gating » est lié à la perméabilité. D'autre part, le pore de Cl_{Ca} peut contenir plusieurs ions à la fois (« multi-ion pore ») puisque Cl_{Ca} montre un phénomène de fraction molaire anormale (« anomalous mole fraction ») (Machaca *et al.*, 2002; Qu & Hartzell, 2000).

Le Ca^{2+} à lui seul n'est pas suffisant pour l'activation maximale du canal, une combinaison de Ca^{2+} et de potentiel étant requise (Arreola *et al.*, 1996). En fait, le Ca^{2+} déplacerait la courbe d'activation de Cl_{Ca} vers des potentiels plus négatifs (Arreola *et al.*, 1996; Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000). Selon le

coefficient de Hill, il y aurait deux sites de liaison pour le Ca^{2+} impliqués dans l'activation de Cl_{Ca} (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000; Nilius & Droogmans, 2002). D'autre part, la liaison du Ca^{2+} est elle-même dépendante du potentiel, ce qui fait que la sensibilité du canal au Ca^{2+} est fonction du potentiel membranaire (Arreola *et al.*, 1996). Chez *Xenopus*, ceci s'exprime par une sensibilité accrue du canal au Ca^{2+} à des potentiels membranaires plus positifs, ce qui se traduit par une augmentation de l'activation à des potentiels plus positifs puisque le Ca^{2+} reste lié au canal pour une plus longue période (Callamaras & Parker, 2000). La dépendance apparente au potentiel de la sensibilité au Ca^{2+} pourrait être en fait due à l'activation Ca^{2+} -dépendante du canal et sa fermeture sensible au voltage (Kuruma & Hartzell, 2000). Contrairement aux canaux BK_{Ca} qui possèdent une dépendance au potentiel intrinsèque et qui peuvent être ouverts par une forte dépolarisation en absence de Ca^{2+} ou fermée en présence de Ca^{2+} à des potentiels hyperpolarisants, Cl_{Ca} requiert la présence de Ca^{2+} intracellulaire pour s'ouvrir (Kuruma & Hartzell, 2000).

Paradoxalement, bien que le Ca^{2+} soit nécessaire à l'activation de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, il peut également causer, à de fortes concentrations, la perte irrémédiable de l'activité du canal (Hirakawa *et al.*, 1999). Notons qu'il y a également un rundown qui n'est pas dépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Hirakawa *et al.*, 1999; Morris & Frizzell, 1993b).

B.2.3 Rôles physiologiques de Cl_{Ca}

Le Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses joue un rôle primordial dans le maintien du potentiel membranaire et de l'excitabilité cellulaire tant au niveau vasculaire qu'au niveau du tube digestif et de la vessie (Sergeant *et al.*, 2001; Cotton

et al., 1997). D'ailleurs, le tonus vasculaire et la contractilité sont très intimement liés au potentiel membranaire du myocyte. Le déclenchement du potentiel d'action (PA) observé dans plusieurs tissus est attribué à une conductance Cl^- (Cotton *et al.*, 1997; Toland *et al.*, 2000). Par ailleurs, de nombreux inhibiteurs de Cl_{Ca} inhibent les PA (Cotton *et al.*, 1997). Les STICs, bien que leur signification physiologique soit encore incertaine, sont considérés comme étant les déclencheurs de PA. De plus, $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ contribue au PM de repos puisque l'inhibition de cette conductance induit une hyperpolarisation (Lamb *et al.*, 1994). Il est à noter qu'avec la résistance d'entrée très élevée ($\approx 3.8 \text{ G}\Omega$) des myocytes d'artère coronaire de lapin, un courant net de seulement 13 pA est suffisant pour maintenir la cellule à un potentiel membranaire de -50 mV (Lamb *et al.*, 1994). Par contre, Hirakawa *et al.* (1999) ont affirmé qu'il n'y avait pas de courant basal compte tenu de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et du seuil d'activation de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ (Hirakawa *et al.*, 1999). Cependant, la stimulation des myocytes vasculaires par des agents vasoconstricteurs endogènes tels que l'ET-1, AngII, NE, etc. déclenche la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS via les RyR et les IP_3R , ce qui stimule $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ et induit donc une dépolarisation membranaire (Guibert *et al.*, 1997; Bakhramov *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 2000b; Byrne & Large, 1988; Klockner & Isenberg, 1991; Pacaud *et al.*, 1991; Dai & Zhang, 2001; Duggan & Tabrizchi, 2000; Large & Wang, 1996; Lamb & Barna, 1998a; Lamb & Barna, 1998b; Liu & Farley, 1996a; Liu & Farley, 1996b; Pallone & Huang, 2002; Scarparo *et al.*, 2000; Salter & Kozlowski, 1998; Strobaek *et al.*, 1996; Yuan, 1997; Zhang *et al.*, 2001). La dépolarisation ainsi induite provoque l'ouverture des canaux Ca_{L} et l'influx calcique qui s'en suit contribue à la contraction du myocyte. Il est également suggéré que $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ soit non

seulement impliqué dans la phase initiale de la contraction (telle que décrite précédemment), mais également dans la phase soutenue de la contraction durant laquelle la $[Ca^{2+}]_i$ est stabilisée (Lamb *et al.*, 1994). Cl_{Ca} serait donc impliqué dans une importante rétroaction positive (voir figure 1.3 dans *Généralités*). De plus, le potentiel d'équilibre des ions Cl^- (E_{Cl}) des myocytes vasculaires étant ≈ -24 mV (soit plus de 20 mV supérieur au PM basal), l'ouverture soutenue de Cl_{Ca} tendra à amener le PM vers E_{Cl} (Aickin & Brading, 1982; Chipperfield & Harper, 2000). Or, la fenêtre du courant calcique en régime établi atteint son apogée à ces mêmes valeurs (voir *Généralités*), faisant ainsi de Cl_{Ca} un outil idéal afin de maintenir le PM à une valeur optimale pour l'ouverture des canaux $Ca_{(L)}$ de manière soutenue. On peut s'attendre à ce que l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ active également les canaux BK_{Ca} . Or, Mironneau *et al.* (1996) ont suggéré que des étincelles Ca^{2+} activent BK_{Ca} , ce qui est probablement dû à une co-localisation de BK_{Ca} et des sites de libération du Ca^{2+} du RS (Nelson *et al.*, 1995), alors que la distribution plus homogène des Cl_{Ca} ferait en sorte que la génération de plusieurs étincelles en série (« vague calcique » ou « Ca^{2+} wave ») élevant la $[Ca^{2+}]_i$ globale soit nécessaire à l'activation de Cl_{Ca} (Mironneau *et al.*, 1996).

Alors que Cl_{vol} semble être plus important dans le tonus myogénique du mésentère de lapin, Cl_{Ca} joue un rôle majeur dans la contraction induite par une stimulation α_1 -adrénergique (Remillard *et al.*, 2000). Également, l'augmentation de l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} en mode inverse est proposée comme un mécanisme impliqué dans l'hypertension (Blaustein, 1993).

B.2.4 Régulation de Cl_{Ca}

L'impact physiologique primordial des Cl_{Ca} suggère une forte régulation par divers mécanismes tels que la phosphorylation afin d'obtenir un contrôle fin et précis de l'activité de ces canaux et donc du tonus vasculaire. D'ailleurs, une phosphorylation par la protéine kinase dépendante de la calmoduline II (CaMKII) inhibe $I_{Cl(Ca)}$ de CML de trachée en accélérant la fermeture du canal sans affecter son activation (Wang & Kotlikoff, 1997a). Par contre, la même kinase semble activer Cl_{Ca} dans d'autres tissus puisque l'inhibition de CaMKII se reflète par une diminution du courant Cl^- , tout comme pour bCLCA1 (Cunningham *et al.*, 1995; McGill *et al.*, 1995). De plus, l'activation de la phosphatase alcaline augmente un courant entrant chez une lignée cellulaire de rein. Cependant, la phosphorylation n'est pas nécessaire pour l'activation de Cl_{Ca} chez le *Xenopus* (Kuruma & Hartzell, 2000). Il est tout de même étonnant de constater le faible nombre d'études sur le sujet.

L'exposition de myocytes à des agents oxydants non-spécifiques, comme le diamide ou même endogènes tel que le peroxyde d'hydrogène, active Cl_{Ca} de façon irréversible (Greenwood *et al.*, 2002a). L'exposition au dithiothréitol (DTT) permet la récupération de l'effet du diamide alors qu'en contrôle, l'agent réducteur n'a aucun effet (Greenwood *et al.*, 2002a). Par conséquent, $I_{Cl(Ca)}$ possède une certaine sensibilité aux réactions d'oxydo-réduction, mais la réduction n'est possible que lorsqu'elle suit une oxydation qui ne semble pas présente physiologiquement.

Étant donné le rôle majeur de Cl_{Ca} dans le tonus vasculaire, la modulation de ce canal par l'endothélium est fort probable. L'hyperpolarisation de la membrane

plasmique du myocyte est un des mécanismes d'action des agents vasodilatateurs endothéliaux (NO, PGI₂, EDHF). Par exemple, l'oxyde nitrique (NO) inhibe I_{Cl(Ca)}, ce qui pourrait induire une hyperpolarisation de la membrane, étayant ainsi l'hypothèse de l'importante fonction de Cl_{Ca} dans le tonus vasculaire (Hirakawa *et al.*, 1999). Pour ce qui est du mécanisme sous-jacent à l'inhibition de I_{Cl(Ca)} par le NO, trois hypothèses ont été suggérées : 1) un effet indirect sur le canal en diminuant la libération de Ca²⁺ du RS par une inhibition des RyR; 2) un effet indirect sur Cl_{Ca} en stimulant la formation de GMPc et 3) un effet direct sur le canal (Hirakawa *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1998).

B.2.5 Pharmacologie des Cl_{Ca}

La caractérisation de canaux ioniques et l'étude de leurs propriétés ainsi que l'importance physiologique de ces derniers nécessitent l'utilisation d'outils tels que des inhibiteurs pharmacologiques. Plusieurs composés structuralement disparates inhibent Cl_{Ca} et ce, dans plusieurs tissus et espèces différentes. Les fénamates, les dérivés stilbènes et de nombreux autres agents chimiques affectent Cl_{Ca} avec des affinités fort différentes et avec des mécanismes bien souvent obscurs.

Les fénamates et l'ANF

L'acide flufénamique (AFF), l'acide tolfénamique (ATF), l'acide méfénamique (AMF), l'acide méclofénamique (AMC) et l'ANF constituent la plus grande famille d'inhibiteurs de Cl_{Ca}, les fénamates. Le plus utilisé de ces composés est l'ANF, étant donné une IC₅₀ de l'ordre du micromolaire (Hogg *et al.*, 1994a), ce

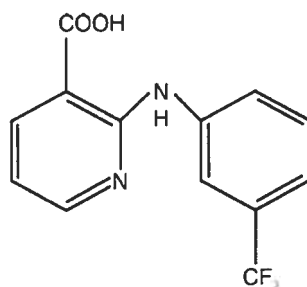


Figure 1.B.2-2 *Structure de l'ANF*

qui en fait le plus puissant inhibiteur de $I_{Cl(Ca)}$ connu à ce jour.

Les fénamates sont composés de deux groupements aromatiques liés par un groupement amine. L'ANF est caractérisé par la présence d'un groupement trifluorométhyl (CF_3) sur le groupement benzène et d'un groupement pyridine (figure 1.B.2-2). Ce composé dérivé de l'acide N-Phénylanthranilique aux propriétés aliphatiques présente un $pK_a = 4.31$, ce qui signifie que la molécule possède une charge négative dans une gamme de pH physiologiques ($\approx 7.2-7.4$) (Polasek *et al.*, 2000). L'ANF fut d'abord reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires. Il est d'ailleurs disponible pour une utilisation clinique dans certains pays européens (Nifluril[®], UPSA, Rueil-Malmaison, France). Ce composé non-stéroïdien aux propriétés analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques inhibe la production de prostaglandines en agissant sur la cyclooxygénase (COX). En plus de son action sur la COX, l'ANF inhibe également certains canaux ioniques, particulièrement les canaux perméables aux anions tels que les $GABA_A$ R, CFTR et Cl_{Ca} (Sinkkonen *et al.*, 2003; Scott-Ward *et al.*, 2004; Hogg *et al.*, 1994a). La portion carboxylique de l'ANF est très importante pour son action inhibitrice sur Cl_{Ca} puisqu'une altération de

ce groupement résulte en une importante diminution de la sélectivité et de la puissance inhibitrice via une réduction de l'interaction avec Cl_{Ca} (Criddle *et al.*, 2002)

L'ANF, étant le plus puissant inhibiteur de Cl_{Ca} , a régulièrement été utilisé afin d'étudier les rôles potentiels de ces courants, entre autres, dans le maintien du tonus vasculaire (Yuan, 1997). Par contre, tout comme plusieurs autres membres des fénamates, l'ANF a des effets non-spécifiques, notamment sur des canaux K^+ provenant de myocytes vasculaires et d'autres tissus tels que BK_{Ca} , K_{ATP} et $K_{V2.1}$, mais également sur d'autres canaux tels qu'un récepteur nicotinique et les RyR (Nagel *et al.*, 2001; Kirkup *et al.*, 1996; Oba *et al.*, 1996; Large & Wang, 1996; Ottolia & Toro, 1994; Li *et al.*, 1998; Hogg *et al.*, 1994b; Greenwood & Large, 1995; White & Aylwin, 1990; Cruickshank *et al.*, 2003). De plus, la puissance avec laquelle l'ANF inhibe $I_{Cl(Ca)}$ varie avec le potentiel membranaire, mais également selon l'approche expérimentale utilisée pour stimuler Cl_{Ca} (Large & Wang, 1996). Effectivement, l' IC_{50} de l'ANF pour les STICs est inférieure à celle requise pour bloquer $I_{Cl(Ca)}$ induit par l'influx Ca^{2+} via Ca_L (Hogg *et al.*, 1994a). Lorsque Cl_{Ca} est étudié avec une $[Ca^{2+}]_i$ tamponnée dans les myocytes de l'artère pulmonaire de lapin, l'ANF bloque le canal seulement à des potentiels positifs, alors qu'une augmentation du courant basal (à -50 mV) en présence d'ANF est observée (Piper & Greenwood, 2003). De plus, le retrait de l'ANF de la solution externe induit une forte augmentation de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ ainsi qu'une accélération des cinétiques d'activation, ce qui suggère que l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF masque une stimulation parallèle du canal qui n'est apparente que par le retrait de la drogue (Piper

& Greenwood, 2003). Un tel effet a également été rapporté pour le DCDPC (Piper & Greenwood, 2003). Une meilleure compréhension de l'interaction entre ces composés et le canal pourrait permettre une représentation plus adéquate du fonctionnement du canal.

Les dérivés stilbènes

Les dérivés stilbènes, soit le « 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid » (DIDS), le « 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid » (SITS) et le « 4,4'-dinitrostilbene-2,2'-disulfonic acid » (DNDS) inhibent les canaux Cl^- en général avec malheureusement peu de distinctions entre les divers types de canaux Cl^- . Avec une constante d'inhibition (IC_{50}) entre 0.2 et 17 μM dans la veine porte de lapin pour le DIDS (Hogg *et al.*, 1994b; Baron *et al.*, 1991), l'utilisation de ce composé dans le but d'évaluer le rôle physiologique des Cl_{Ca} doit être effectuée avec précaution, puisque le DIDS inhibe également l'échangeur HCO_3^- et les canaux $\text{K}_{\text{V}4.3}$ (Davis, 1992; Wang *et al.*, 1997a). Ce composé inhibe de façon covalente les canaux (Oba *et al.*, 1996), bien que plusieurs travaux rapportent une récupération de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ suivant le retrait de l'inhibiteur de la solution (Kim *et al.*, 2003; Piper & Greenwood, 2003; Qu & Hartzell, 2001). Quoiqu'il en soit, l'inhibition de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de myocytes vasculaires par le DIDS ou le SITS est complexe et n'est pas affectée par le potentiel membranaire (Large & Wang, 1996; Hogg *et al.*, 1994b), ne favorisant pas l'hypothèse de l'obstruction du pore malgré les résultats obtenus par Qu & Hartzell (Qu & Hartzell, 2001). Ces derniers présentent une inhibition de $\text{I}_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de *Xenopus* par le DIDS qui dépend nettement du potentiel membranaire (Qu & Hartzell, 2001).

Cette divergence pourrait s'expliquer par une différence entre les canaux des deux préparations.

Autres inhibiteurs de Cl_{Ca}

Parmi les autres composés ne faisant pas partie des deux familles précédentes mais également utilisés comme inhibiteurs de Cl_{Ca} , on retrouve, entre autres, le « indanyoxyacetic acid » (IAA-94), le « anthracene-9-carboxylic acid » (A-9-C), le « 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid » (NPPB), le furosemide et l'acide éthacrynique. Le A-9-C inhibe $I_{Cl(Ca)}$ d'une manière qui varie avec le potentiel membranaire et bloque probablement le pore à l'état ouvert (« open-state block ») (Large & Wang, 1996; Qu & Hartzell, 2001; Hogg *et al.*, 1994b). Par analogie à l'ANF, l'A-9-C a un effet stimulant sur Cl_{Ca} qui n'est révélé que par la dissociation à des potentiels négatifs du A-9-C du canal (Piper & Greenwood, 2003). D'autre part, l'inhibition d' $I_{Cl(Ca)}$ par le NPPB est également supérieure à des potentiels positifs (Wu & Hamill, 1992). Par contre, l'action de l'acide éthacrynique ou du furosemide n'est pas dépendante du voltage (Greenwood *et al.*, 1995). Notons que l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par la méfloquine et des anesthésiques volatiles (tels que l'isoflurane et la sevoflurane) a également été rapportée (Toma *et al.*, 1996; Maertens *et al.*, 2000).

En bref, la séquence de puissance des principaux inhibiteurs de canaux Cl_{Ca} utilisés dans la veine porte de lapin est ANF > IAA-94 > DIDS > A-9-C > SITS (Large & Wang, 1996). Par contre, l'utilisation de ces composés nécessite la prudence puisque aucun de ceux-ci n'est véritablement spécifique. Le plus puissant, l'ANF, affecte d'autres canaux anioniques et canaux K^+ et va même jusqu'à stimuler

Cl_{Ca} de l'artère pulmonaire de lapin. Par conséquent, l'utilisation de plusieurs inhibiteurs et/ou d'un milieu où le K^+ est absent, de concert avec des inhibiteurs des canaux K^+ , peut être nécessaire pour l'étude de Cl_{Ca} .

Deuxième partie : Ca^{2+} , calmoduline et enzymes

Le Ca^{2+} est un élément essentiel pour de nombreuses fonctions cellulaires diversifiées, dont la contraction musculaire lisse. Or, nombre de ces fonctions sont effectuées par l'intermédiaire de protéines telle que la calmoduline (CaM) à un tel point que l'absence de CaM est létale (Van Eldik & Watterson, 1998). La calmoduline (**Ca**lcium **M**odul**a**tor Prote**i**n), une des protéines eucaryotes les plus conservées, fut découverte au début des années 1970 et d'abord associée à l'activation d'une phosphodiesterase (Cheung, 1970; Kakiuchi & Yamazaki, 1970). L'exigence du Ca^{2+} pour l'activité de la CaM et les autres fonctions de la protéine ne fut démontré que subséquemment (Teo & Wang, 1973; Teo *et al.*, 1973).

La CaM est formée de deux lobes reliés par une longue chaîne polypeptidique (Nelson & Chazin, 1998). Ces deux lobes, des domaines de liaison du Ca^{2+} , sont composés d'une paire de structures en hélice-boucle-hélice, nommées motifs « EF-hand ». Chacun de ces motifs permet de lier un ion Ca^{2+} et la CaM peut donc lier quatre ions Ca^{2+} à la fois. En plus d'avoir une forte affinité pour le Ca^{2+} , plusieurs évidences suggèrent que la CaM lie le Ca^{2+} de façon fortement coopérative (Nelson & Chazin, 1998).

Peu de Ca^{2+} cellulaire lie la CaM à l'état basal étant donné la faible affinité globale de l'apocalmoduline pour le Ca^{2+} ($K_d \approx 1 \mu\text{M}$) (Nelson & Chazin, 1998). Par contre, un signal calcique (une étincelle calcique, par exemple) élève localement ou globalement la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et active la CaM. La liaison coopérative du Ca^{2+} active la CaM en induisant un changement de conformation de la protéine lui permettant de lier des

effecteurs. Parmi les cibles du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, on retrouve principalement des enzymes telles que l'oxyde nitrique synthase, les protéines kinases dépendantes de la calmoduline (CaMK), la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK), la calcineurine, etc. et des canaux ioniques tels que les canaux K^+ de petite conductance activés par le Ca^{2+} , les canaux Ca_{L} , les RyR et les IP_3R (Van Eldik & Watterson, 1998; Nelson & Chazin, 1998; Hamilton *et al.*, 2000; Persechini & Stemmer, 2002; Schumacher *et al.*, 2001; Walsh, 1994).

Section C : Kinase dépendante de la calmoduline (CaMKII)

La protéine kinase dépendante de la calmoduline est une protéine multimérique et multifonctionnelle, phosphorylant les résidus sérine et thréonine. Un mécanisme d'activation très particulier nécessitant la liaison du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ ainsi que des processus d'autophosphorylation caractérise cette kinase ubiquitaire. Elle est, par ailleurs, impliquée dans diverses fonctions telles que la mémoire, l'homéostasie calcique, etc. Certaines évidences suggèrent même son implication dans la régulation des Cl_{Ca} (pour références : (Braun & Schulman, 1995; Hanson & Schulman, 1992; Lukas *et al.*, 1998; Singer *et al.*, 1996; Soderling & Stull, 2001; Bayer & Schulman, 2001; Hook & Means, 2001; Hudmon & Schulman, 2002b; Hudmon & Schulman, 2002a; Lisman, 1994; Lisman *et al.*, 2002; Rongo, 2002; Schulman *et al.*, 1992; Schulman, 1993; Schulman & Hanson, 1993).

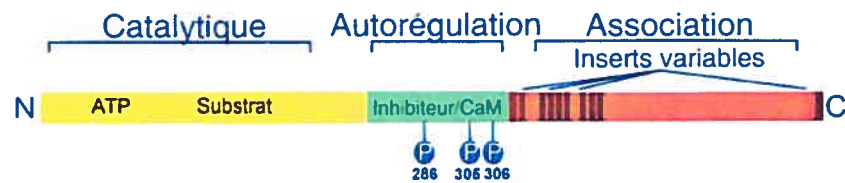
C.1 Structure de CaMKII

Quatre isoformes de CaMKII ont été identifiées (α , β , δ et γ) et chacune est sujette à l'épissage alternatif (Braun & Schulman, 1995). Les isoformes α et β sont presque exclusivement exprimées dans le cerveau, alors que δ et γ sont ubiquitaires (Braun & Schulman, 1995). Les isoformes α et β sont les plus étudiées, étant donné leur grande concentration dans le tissu de l'hippocampe (2% de toutes les protéines).

Chaque sous-unité est composée d'un domaine N-terminal possédant l'activité catalytique, un domaine C-terminal qui permet l'association des sous-unités pour former un oligomère et entre les deux, un domaine d'autorégulation (figure 1.C.1-1A) (Braun & Schulman, 1995). La structure quaternaire de 330 Å de diamètre de l' α -CaMKII a été résolue à l'aide de la microscopie électronique par Kolodziej *et coll.* (2000) qui ont rapporté que 12 sous-unités s'associent et forment deux anneaux hexamériques superposés (figure 1.C.1-1B) (Kolodziej *et al.*, 2000). Alors que le corps de l'enzyme présente la forme d'une roue d'engrenage, le domaine catalytique des sous-unités, en forme de pied, est attaché par un segment étroit au domaine d'ancrage. Par contre, Morris *et coll.* (2001) rapportent que les 12 sous-unités sont agencées en un seul anneau (figure 1.C.1-1C) (Morris & Torok, 2001).

Puisque les différentes isoformes ont des constantes d'activation par la CaM distinctes et que CaMKII est retrouvée sous forme d'homomères et d'hétéromères, la dépendance à la CaM peut varier (De Koninck & Schulman, 1998). La composition des hétéromultimères peut être influencée par la disponibilité des différentes sous-unités. Par exemple, chez le rat, 45% de α est associé avec toutes les sous-unités β

A



B



C

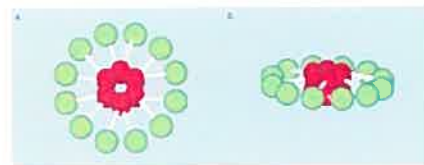


Figure 1.C.1-1 *Structure de CaMKII*

A. Diagramme linéaire d'une sous-unité de CaMKII (Hudmon & Schulman, 2002b). **B.** Représentation graphique de α -CaMKII (doré) et de l'enzyme tronquée (rouge) obtenue par cristallographie avec une résolution de 25Å (Kolodziej *et al.*, 2000) **C.** Modèle tridimensionnel de la structure de α -CaMKII, les domaines d'associations en rouge et les domaines catalytiques en vert obtenu par microscopie électronique (Morris & Torok, 2001).

disponibles et les autres sous-unités α sont organisées en homomultimères (Brocke *et al.*, 1999; Hook & Means, 2001).

C.2 Mécanismes d'activation

À l'état basal, CaMKII est non-phosphorylée et le site catalytique de chaque sous-unité est obstrué par son propre domaine auto-inhibiteur. Cette interaction entre

le domaine auto-inhibiteur et le site catalytique est de type pseudosubstrat, donc le domaine auto-inhibiteur possède des acides aminés ou des résidus qui miment le substrat ou le nucléotide qui interagit avec le site catalytique l'empêchant ainsi d'avoir accès à ce dernier. La liaison d'un activateur allostérique induit un changement de conformation du domaine auto-inhibiteur, ce qui permet ainsi l'accès du substrat au site catalytique.

L'activation de CaMKII est dépendante du Ca^{2+} , mais de façon indirecte. En fait, ce processus nécessite l'intermédiaire de la CaM. Le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ se lie à une sous-unité de la CaMKII en tant qu'activateur allostérique et expose le résidu Thr²⁸⁶ de la région autorégulatrice. L'enzyme est ainsi activée et peut, par la suite, phosphoryler et moduler les substrats. Par contre, la particularité principale de CaMKII est que suite à cette activation, l'enzyme puisse rester active, indépendamment de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ceci nécessite une autophosphorylation entre deux sous-unités. Il faut donc que deux sous-unités adjacentes lient le complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, permettant la libération du site catalytique, afin qu'il y ait phosphorylation d'au moins une des deux sous-unités concernées. Cette autophosphorylation permet alors à cette sous-unité d'être active même si la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ diminue (Braun & Schulman, 1995). En fait, cette phosphorylation au résidu Thr²⁸⁶ (pour α et Thr²⁸⁷ pour β , δ et γ) stabilise la sous-unité dans une conformation active où le domaine auto-inhibiteur ne peut exercer son action sur le site catalytique, comme lorsqu'il y a liaison avec $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Par conséquent, l'enzyme restera active tant qu'elle ne sera pas déphosphorylée par une phosphatase ou par elle-même (autodéphosphorylation). L'affinité pour la CaM (complexée au Ca^{2+}) est fortement

augmentée suite à la phosphorylation de Thr²⁸⁶ (De Koninck & Schulman, 1998; Meyer *et al.*, 1992; Rich & Schulman, 1998). Ce phénomène appelé « piégeage » de la CaM (« trapping »), résulte en une diminution importante de la constante de dissociation de la CaM. En fait, la phosphorylation altère la conformation de CaMKII afin de permettre un contact optimal avec Ca²⁺/CaM et donc de favoriser le maintien de la liaison de la CaM.

Ce mode d'activation particulier permettrait la détection de la fréquence des oscillations calciques (De Koninck & Schulman, 1998). En effet, dans le cas d'un stimulus qui n'augmenterait que légèrement la [Ca²⁺]_i, l'enzyme ne serait activée que transitoirement par l'association de Ca²⁺/CaM sans toutefois qu'il y ait autophosphorylation (Hudmon & Schulman, 2002a). Par contre, si une autre stimulation de même ordre survient avant que le niveau de [Ca²⁺]_i diminue suffisamment pour que le complexe Ca²⁺/CaM se sépare de CaMKII, un certain taux de phosphorylation de CaMKII pourrait alors être atteint. Par conséquent, étant donné la rapidité d'un signal calcique, l'autophosphorylation de Thr²⁸⁶ permettrait de potentialiser le signal Ca²⁺ (Hudmon & Schulman, 2002a). La nature du stimulus extracellulaire produit des oscillations calciques de différentes fréquences et l'intégration de ces oscillations calciques à fréquences variables influencent, entre autres, la transcription génique. Bien que non formellement démontré, les mécanismes moléculaires impliqués dans l'intégration des signaux calciques postulés sont composés de facteurs extrinsèques et intrinsèques. Une hypothèse postulée est la « détection d'intervalles » qui consiste en la déphosphorylation entre les stimuli, ce qui serait alors l'étape critique et limitante. Si l'intervalle entre deux stimuli est

suffisamment long pour permettre la déphosphorylation, il n'y aura pas de potentialisation de l'activité de CaMKII. Un autre modèle consiste en un ordre séquentiel de phosphorylation de Thr²⁸⁶ et une phosphorylation accrue et soudaine (« burst ») de Thr³⁰⁵/Thr³⁰⁶ serait responsable de ce processus. La liaison de Ca²⁺/CaM et l'autophosphorylation concomitante pourraient faire part du mécanisme. Dans le cas d'une stimulation à haute fréquence, l'intervalle interstimuli est trop court pour permettre la dissociation totale de Ca²⁺/CaM, augmentant la probabilité que les oscillations calciques produisent une autophosphorylation. Il s'en suit un accroissement de la probabilité que la CaM reste associée à la sous-unité pour les impulsions Ca²⁺ subséquentes.

Suivant l'autophosphorylation de Thr²⁸⁶ et la dissociation de CaM, CaMKII entreprend une vague de phosphorylations qui inhibent une activation subséquente par Ca²⁺/CaM, processus nommé CaM « capping » (Rich & Schulman, 1998). Les sites de phosphorylation (résidus Thr³⁰⁵ et Thr³⁰⁶) sont situés dans le domaine de liaison de Ca²⁺/CaM et préviennent la liaison subséquente de Ca²⁺/CaM. La raison physiologique de ces dernières phosphorylations serait de marquer les sous-unités fonctionnellement activées ou autophosphorylées pour qu'ainsi ces sous-unités ne compétitionnent plus avec les sous-unités inactives pour le Ca²⁺/CaM libre pour être activées.

La CaMKII est inactivée par une déphosphorylation indépendante de la [Ca²⁺]_i. Cette déphosphorylation peut être effectuée par l'enzyme elle-même (autodéphosphorylation) (Kim *et al.*, 2001). Elle peut également l'être *in vitro* par les phosphatases PP1, PP2A et PP2C (Bhalla & Iyengar, 1999; Millward *et al.*,

1999;Makhinson *et al.*, 1999;Strack *et al.*, 1997b;Bennechib *et al.*, 2001). La calcineurine peut également désactiver CaMKII, mais très faiblement. Par contre, la déphosphorylation extrinsèque *in vivo* ne semble dépendre que de la PP2A et PP1 (Strack *et al.*, 1997a).

C.3 Pharmacologie

Étant donné que l'activation de la CaMKII dépend de la CaM, les inhibiteurs de la CaM sont des inhibiteurs efficaces de la kinase. Par contre, l'utilisation de composés tels que le W-7 ou le calmidazolium est peu spécifique puisque tous les effecteurs de la CaM sont affectés simultanément.

D'autres composés comme le KN-62 ont été développés afin d'inhiber plus spécifiquement la CaMKII (Tokumitsu *et al.*, 1990;Hidaka *et al.*, 1990;Hidaka & Yokokura, 1996). Puisque le KN-62 exerce son action inhibitrice sur CaMKII en compétitionnant avec Ca^{2+} /CaM, ce composé n'affecte que la forme non activée de l'enzyme ($K_i = 0.9 \mu\text{M}$) (Tokumitsu *et al.*, 1990;Hidaka *et al.*, 1990). Malheureusement, le KN-62 n'est pas sélectif entre les différentes CaMK (Hidaka & Yokokura, 1996). Le KN-93 est un dérivé du KN-62 plus soluble dans l'eau et plus spécifique pour la CaMKII. Il inhibe également la kinase de façon compétitive avec Ca^{2+} /CaM et est sans effet sur la forme phosphorylée de la kinase, tout comme son prédécesseur (Singer *et al.*, 1996). Notons cependant que des effets non-spécifiques ont été rapportés pour le KN-93 et son analogue inactif, le KN-92, sur des canaux potassiques de CML (Ledoux *et al.*, 1999).

Un peptide, ARIP (Autocamtide-2 Related Inhibitory Peptide) peut également être utilisé afin d'inhiber CaMKII avec une grande spécificité. Ce peptide, qui correspond au segment auto-inhibiteur de l'enzyme, inhibe avec K_i de 40 nM (Ishida *et al.*, 1995). Le seul facteur limitant à l'utilisation d'un tel produit est qu'il doit pénétrer dans la cellule afin d'atteindre l'enzyme.

C.4 Rôles physiologiques

La CaMKII joue de nombreux rôles tout aussi importants que diversifiés. Elle est impliquée dans les processus de mémoire, la régulation de la libération de neurotransmetteurs, l'hypertrophie cardiaque, l'homéostasie calcique et plusieurs canaux ioniques, etc.

CaMKII joue un rôle primordial dans la transmission synaptique et est requise pour le « Long Term Potentiation » (LTP), phénomène de la mémorisation (Blitzer *et al.*, 1998; Lisman *et al.*, 2002; Rongo, 2002; Braun & Schulman, 1995; Gardoni *et al.*, 2001). En fait, CaMKII est impliquée dans la détection des fréquences de stimulation. L'activation de CaMKII par l'influx calcique médié par les récepteurs NMDA est critique pour l'induction du LTP. La CaMKII ainsi activée va phosphoryler et activer (augmentation de conductance unitaire) le récepteur GluR1 (un récepteur AMPA) (Gardoni *et al.*, 1999; Gleason *et al.*, 2003; Bayer *et al.*, 2001).

L'hypertrophie cardiaque induite par l'endothéline dépend également de CaMKII (Zhu *et al.*, 2000). Les mécanismes sous-jacents restent à élucider, mais il semble que la régulation de la transcription génique soit impliquée.

La phosphorylation par la CaMKII affecte l'activité de nombreux canaux et échangeurs ioniques ainsi que l'homéostasie calcique. Ainsi, CaMKII stimule les canaux $\text{Ca}_{(L)}$ (facilitation Ca^{2+} -dépendante) de cellules musculaires lisses et cardiaques (Singer *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001b; Keef *et al.*, 2001; Yuan & Bers, 1994; Anderson *et al.*, 1998). De plus, CaMKII colocalise avec les canaux $\text{Ca}_{(L)}$ et RyR cardiaques (Wu *et al.*, 2001b; Braun & Schulman, 1995). L'activation des RyR du muscle squelettique découle également de la phosphorylation par CaMKII (Dulhunty *et al.*, 2001; Bayer *et al.*, 1998). D'ailleurs, l'augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]$ du RS par CaMKII est obtenue à la fois par la phosphorylation de phospholamban qui retire son effet inhibiteur sur la pompe Ca^{2+} -ATPase du RS (SERCA) (Singer *et al.*, 1996; Braun & Schulman, 1995) ainsi qu'une phosphorylation directe de SERCA qui augmente davantage son activité catalytique (Li *et al.*, 1998; Braun & Schulman, 1995).

Dans les CML, CaMKII module la contraction de par son rôle dans l'homéostasie Ca^{2+} , mais également via l'appareil contractile. La phosphorylation de la caldesmone, une protéine régulatrice de la contraction associée aux filaments fins d'actine, a pour effet de diminuer sa liaison inhibitrice à la myosine (Braun & Schulman, 1995). CaMKII peut également phosphoryler la MLCK afin de diminuer sa sensibilité à $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ et donc désensibiliser la MLCK aux stimuli contractiles subséquents (Braun & Schulman, 1995).

Section D : Calcineurine

Parallèlement à une protéine kinase dépendante de Ca^{2+} /CaM qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine, les cellules de mammifères expriment également de façon ubiquitaire une phosphatase ayant pour cible les mêmes résidus, la calcineurine (CaN). Une particularité de cette phosphatase est qu'elle est également, tout comme CaMKII, activée par le Ca^{2+} et la CaM. CaN est de plus une protéine multifonctionnelle avec des rôles dans la réponse immunitaire, la mémoire, l'apoptose, etc (Perrino & Soderling, 1998; Sugiura *et al.*, 2001; Rusnak & Mertz, 2000; Ferri *et al.*, 2000).

D.1 Structure de la calcineurine

Isolée à l'origine du cortex de bœuf, la calcineurine (CaN) est un hétérodimère composé d'une grosse sous-unité, la CaNA, ainsi que d'une plus petite, la CaNB. Même à des $[\text{Ca}^{2+}]$ inférieures à 100 nM, les deux sous-unités sont liées, mais l'enzyme est inactive. La structure cristalline de CaN a été résolue lorsque liée avec le complexe cyclosporine A/cyclophiline A (CsA/CypA) (figure 1.D.1-1) (Jin & Harrison, 2002) et avec FKBP12/FK506 (Kissinger *et al.*, 1995) à une résolution allant jusqu'à 3.1 Å. La séquence en acides aminés de la CaN est fortement conservée entre les espèces, allant de la levure à l'humain (Klee *et al.*, 1998) (pour références : (Hill-Eubanks *et al.*, 2003; Antoni *et al.*, 1998; Hemenway & Heitman, 1999; Herzig & Neumann, 2000; Klee *et al.*, 1998; Perrino & Soderling, 1998; Rusnak & Mertz, 2000; Sugiura *et al.*, 2001; Matsuda & Koyasu, 2000)).

Jusqu'à présent, 3 isoformes de la CaNA ont été identifiées (α , β et γ) chez les mammifères et sont le produit de trois gènes différents (Klee *et al.*, 1998; Perrino & Soderling, 1998; Herzig & Neumann, 2000). Il y a une forte homologie (83-89%) entre les isoformes, à l'exception des extrémités amino- et carboxy-terminales dont les fonctions sont inconnues pour le moment (Perrino & Soderling, 1998). La particularité principale de CaNA est sans aucun doute le fait qu'elle possède à la fois le domaine catalytique (résidus 71-325), le domaine régulateur et le site de liaison de la CaNB et de la CaM (résidus 391-414) (Perrino & Soderling, 1998; Feng & Stemmer, 1999).

Pour ce qui est de la CaNB, deux isoformes, produits de deux gènes

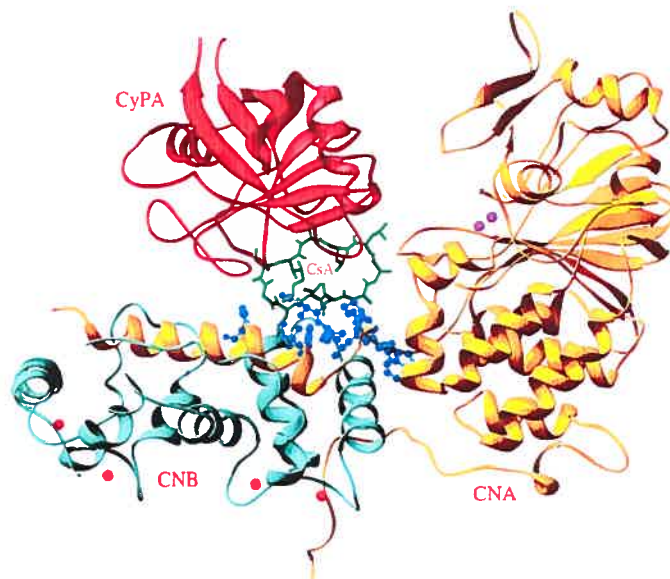


Figure 1.D.1-1 Structure de la calcineurine

A. Représentation graphique du complexe formé de la CaN, la cyclophiline A et la cyclosporine A. Calcineurine A (CNA) : or; Calcineurine B (CNB) : cyan; Cyclophiline A (CyPA) : rouge; Cyclosporine A (CsA) : vert; Ions zinc et fer : rose; Ions calcium : rouge (dans CNB). Les résidus de la calcineurine impliqués dans la liaison avec la CsA/CyPA sont représentés en billes bleues (Huai *et al.*, 2002).

différents, ont été rapportées, CaNB1 et CaNB2 (Perrino & Soderling, 1998; Herzig & Neumann, 2000). Cette dernière n'est toutefois exprimée que dans les testicules, tout comme la CaNA γ (Perrino & Soderling, 1998). La CaNB est une protéine de type « EF-hand », tout comme la CaM, et sa structure secondaire s'apparente à celle de la CaM, ce qui lui permet de lier 4 ions Ca^{2+} à la fois (Feng & Stemmer, 1999). Un de ces sites a une haute affinité pour le Ca^{2+} ($K_d < 100 \text{ nM}$) et est pratiquement toujours occupé, alors que les trois autres présentent des constantes de dissociation entre 0.5 et 1 μM et sont occupés suite à une augmentation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Klee *et al.*, 1998). De plus, le site de haute affinité pour le Ca^{2+} de la CaNB a une fonction structurale très importante en permettant une plus grande stabilité de l'enzyme (Klee *et al.*, 1998). La CaNB est également le site d'interaction des phospholipides, donc du site de myristoylation associant la CaN à la membrane (Perrino & Soderling, 1998; Rusnak & Mertz, 2000).

D.2 Mécanismes d'activation

L'activation particulière de la CaN requiert indépendamment la présence de Ca^{2+} et de CaM. Indépendamment puisque le Ca^{2+} est, bien sûr, nécessaire à l'activation de la CaM et à sa liaison subséquente avec la CaNA, mais surtout parce que le Ca^{2+} active directement la CaN en se liant à la sous-unité B et est nécessaire à l'activation de CaN (figure 1.D.2-1). En fait, la CaN est, de façon basale, sous une forme auto-inhibée, tout comme CaMKII, le domaine régulateur de la CaNA possédant une région considérée auto-inhibitrice (résidus 457-482). Parallèlement, le repliement du domaine régulateur (résidus 374-389) fait en sorte que la région auto-

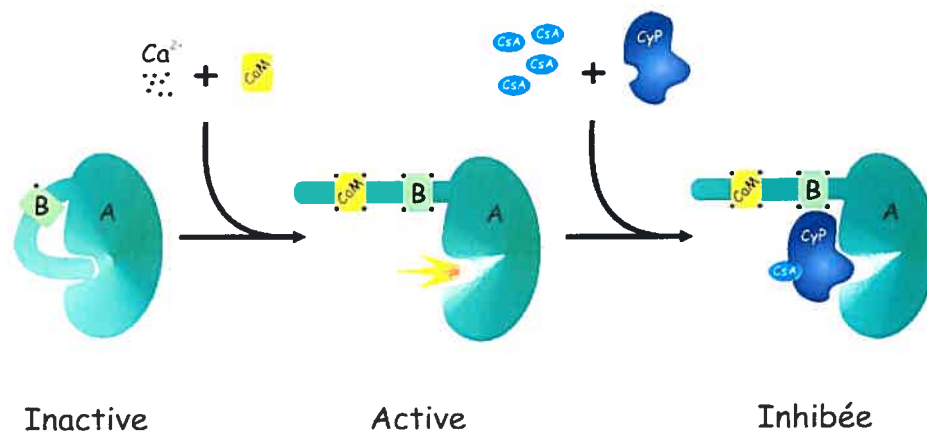


Figure 1.D.2-1 *Activation de la calcineurine*

Illustration du mécanisme d'activation et de l'inhibition de la calcineurine par le Ca^{2+} et la calmoduline. Sous la forme inactive, le domaine auto-inhibiteur de la calcineurine A obstrue le site catalytique (Inactive). L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et la liaison du complexe Ca^{2+} /calmoduline relève l'autoinhibition de la CaNA (Active). La cyclosporine A (complexée à la cyclophiline) inhibe la CaNA en se liant au site catalytique (inhibée). CaNA : A; CaNB : B; Calmoduline : CaM; Ions Ca^{2+} : billes noires; Cyclosporine A : CsA; Cyclophiline A : CyP.

inhibitrice obstrue l'accès au site catalytique de l'enzyme en s'y liant (Klee *et al.*, 1998; Perrino, 1999).

La liaison du Ca^{2+} avec la CaNB induit une légère augmentation du V_{\max} (vitesse maximale de réaction enzymatique avec une concentration saturante du substrat), mais abaisse grandement le K_m (concentration de substrat afin que la vitesse de réaction enzymatique soit équivalente à la moitié de V_{\max}), ce qui se traduit par une faible augmentation de l'activité de CaN (Klee *et al.*, 1998; Hemenway & Heitman, 1999). D'autre part, le Ca^{2+} lié à la CaNB est nécessaire ou permissif à la liaison de la CaM à la CaN (Perrino & Soderling, 1998).

L'association du complexe Ca^{2+} /CaM à CaNA (résidus 390-414) induit un changement conformationnel du domaine régulateur, relevant ainsi l'auto-inhibition

exercée et exposant le site catalytique de l'enzyme (Klee *et al.*, 1998; Perrino & Soderling, 1998). La liaison de la CaM augmente jusqu'à 10 fois l'activité de l'enzyme tout en n'ayant aucun effet sur le K_m (Klee *et al.*, 1998). Donc, la formation du complexe CaNA-CaNB-CaM en présence de Ca^{2+} augmente de 100 à 200 fois l'activité basale de la CaN sans pour autant affecter son affinité pour les substrats. Toutefois, la liaison entre la CaN et la CaM dépend énormément du Ca^{2+} . En présence de Ca^{2+} , la CaM possède une très forte affinité pour la CaN. De fait, et compte tenu que la CaM est activée par des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de 0.3-1 μM , en présence de 1 μM CaM, les $[\text{Ca}^{2+}]_i$ d'une cellule stimulée sont suffisantes pour activer CaN (Perrino & Soderling, 1998; Hemenway & Heitman, 1999). L'ablation du segment auto-inhibiteur et de quelques résidus supplémentaires en amont (résidus 420-482) rend la CaN indépendante du Ca^{2+} et de la CaM et donc, constitutivement active (Perrino *et al.*, 2002).

La phosphorylation *in vitro* de la CaN par CaMKII, PKC et caséine kinase I et II a été rapportée (Hemenway & Heitman, 1999). Elle peut toutefois être empêchée par la présence de Ca^{2+} /CaM, ce qui indique que le site de phosphorylation est probablement adjacent au site de liaison de Ca^{2+} /CaM (Hemenway & Heitman, 1999). Une telle phosphorylation, bien que jamais rapportée *in vivo*, inhibe l'activité catalytique de CaN soit en doublant le K_m ou en diminuant de 50% le V_{\max} , selon le substrat.

D.3 Pharmacologie

Tout comme pour CaMKII, des inhibiteurs de CaM peuvent être utilisés, mais leur action n'est pas spécifique. Toutefois, deux principaux composés structuralement très différents sont généralement utilisés pour inhiber CaN. Il s'agit de la Cyclosporine A (CsA), un composé peptidique cyclique d'origine fongique et le FK506, une lactone macrocyclique isolée d'une toxine bactérienne (Bultynck *et al.*, 2000; Jin & Harrison, 2002; Matsuda & Koyasu, 2000). Dans les deux cas, l'action de l'agent pharmacologique nécessite l'interaction avec des protéines endogènes, des immunophilines, la cyclophiline A (CyP) et la FKBP12 (pour la CsA et le FK506, respectivement). Ces deux protéines, tout comme leurs ligands, sont très différentes tant sur le plan de la séquence en acides aminés que sur la structure tridimensionnelle. Malgré leurs différences, les deux complexes (CsA/CyP et FK506/FKBP12) lient le même site de la CaN, soit à l'interface de la CaNA et CaNB (figure 1.D.1-1) (Perrino & Soderling, 1998). Avec une IC_{50} *in vitro* pour les complexes de 10^{-9} M, cette inhibition n'est aucunement compétitive avec le substrat (Perrino & Soderling, 1998). Quoiqu'il en soit, ces composés ont malheureusement certains effets non spécifiques.

L'immunophiline de 12 kDa, FKBP12, est également impliquée dans la régulation de la libération du Ca^{2+} intracellulaire. En plus d'être un ligand pour le FK506 et ainsi inhiber la CaN, elle fait partie intégrante des IP_3R et des RyR du muscle squelettique et des RyR des myocytes cardiaques (Bultynck *et al.*, 2000; Carmody *et al.*, 2001; Cameron *et al.*, 1995; Mackrill, 1999; duBell *et al.*, 1998). Par conséquent, l'exposition de la cellule au FK506 affecte la libération des réserves

intracellulaires en augmentant la probabilité d'ouverture des RyR et leur temps d'ouverture (Bultynck *et al.*, 2000). La protéine stabilise le RyR et est responsable de la rectification du courant attribué aux RyR (Bultynck *et al.*, 2000). D'autre part, le FK506 induit une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ en inhibant la pompe Ca^{2+} -ATPase (SERCA) du RS (Bultynck *et al.*, 2000).

La CsA, lorsqu'elle s'associe à la CyP, modifie son activité enzymatique endogène et ceci de façon indépendante à son action sur la CaN (rôle dans le repliement protéique (Jin & Harrison, 2002; Matsuda & Koyasu, 2000)) pour s'en servir afin d'inhiber la CaN. De plus, la CsA est néphrotoxique puisqu'elle augmente la réabsorption tubulaire sodique ainsi que la perte de Mg^{2+} tout en provoquant une défaillance de la sécrétion de molécules organiques (Gordjani *et al.*, 2000). Elle cause également une vasoconstriction qui n'est pas reliée à son effet sur la CaN puisque le même effet est observé par l'administration de Cyclosporine H (CsH), analogue inactif de la CsA (Avdonin *et al.*, 1999). Bien que la CsA (dose thérapeutique de 0.1 à 10 μM) n'affecte pas la $[Ca^{2+}]_i$ basale, elle potentialise l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ suite à la stimulation par l'AngII (Avdonin *et al.*, 1999). La vasoconstriction induite par la CsA est responsable des principaux effets secondaires de la drogue, soit l'hypertension artérielle et la défaillance rénale (Frapier *et al.*, 2001). L'injection intracoronarienne de CsA chez le chien provoque une vasoconstriction endothélium-dépendante et des mécanismes myogéniques (Khalil *et al.*, 1996; Frapier *et al.*, 2001).

La CaN est également inhibée par l'acide okadaïque et la microcystine avec des IC_{50} de 300 nM et 0.2 μM , respectivement (Rusnak & Mertz, 2000). Ces deux

composés inhibent aussi la PP1 et la PP2A, mais à des concentrations différentes de celles affectant la CaN (Rusnak & Mertz, 2000).

D.4 Rôles physiologiques

La distribution ubiquitaire et le haut niveau d'homologie de la levure à l'humain d'une protéine telle que la CaN suggèrent que cette protéine joue des rôles aussi divers qu'importants. D'ailleurs, mis à part son effet fort connu sur la régulation de la transcription de l'interleukine 2 (IL-2) et donc son rôle dans le système immunitaire, la CaN est également impliquée dans l'hypertrophie cardiaque, la mémoire et la régulation de l'activité de canaux ioniques.

L'IL-2 joue un rôle majeur pour l'activation des lymphocytes T (Sugiura *et al.*, 2001). La transcription de IL-2 nécessite le fonctionnement de NFAT (Nuclear Factor for Activated T-lymphocyte) (Sugiura *et al.*, 2001). Cette protéine NFAT est phosphorylée par la PKA, ce qui empêche sa translocation dans le noyau pour effectuer la transcription. La CaN, en déphosphorylant NFAT, permet sa translocation au noyau et joue ainsi un rôle dans la transcription génique (Hill-Eubanks *et al.*, 2003; Hemenway & Heitman, 1999).

Le cœur d'une souris transgénique chez laquelle la CaN est constitutivement active et spécifiquement exprimée dans les cardiomyocytes est de deux à trois fois plus gros que celui d'une souris normale (De Windt *et al.*, 2000). Les inhibiteurs de la CaN, CsA et FK506, diminuent l'hypertrophie de cardiomyocytes néonataux en culture induite par l'AngII ou la phényléphrine (PE) (Molkentin *et al.*, 1998; Goldspink *et al.*, 2001). Ces inhibiteurs réduisent également l'hypertrophie ou

la dilatation de trois différents modèles transgéniques de cardiomyopathie (Sussman *et al.*, 1998). De plus, l'activité de la CaN est augmentée jusqu'à 32 fois suite à une hypertrophie due à une surcharge de pression et l'hypertrophie est partiellement renversée par l'administration de CsA (Lim *et al.*, 2000). Par contre, dans certains cas, quelques patients sous traitement avec la CsA ont développé une hypertension et une hypertrophie cardiaque (Leinwand, 2001). La néphrotoxicité proscriit également l'utilisation de CsA comme prophylactique (Leinwand, 2001).

La CaN est aussi impliquée dans le contrôle de l'excitabilité neuronale en contrôlant l'activité de canaux ioniques, la libération de neurotransmetteurs, la plasticité synaptique et la transcription génique (Perrino & Soderling, 1998). Par exemple, la CaN altère les propriétés de « gating » des récepteurs NMDA et en promouvoit la désensibilisation en plus de supprimer l'exocytose du glutamate des terminaisons présynaptiques.

L'interaction de la CaN avec Bcl-2 et la déphosphorylation de BAD, deux protéines impliquées dans l'apoptose, a été rapportée et suggère un rôle pour l'enzyme dans ce processus de mort cellulaire programmée (Perrino & Soderling, 1998; Ferri *et al.*, 2000). D'ailleurs, ET-1 inhibe l'apoptose des cardiomyocytes via la CaN (Kakita *et al.*, 2001).

Plusieurs canaux ioniques sont la cible de CaN. D'ailleurs, dans les cellules neuronales tout comme dans les CML, la CaN inhibe les courants $Ca_{(L)}$ en participant à l'inactivation Ca^{2+} -dépendante (Perrino & Soderling, 1998; Herzig & Neumann, 2000). Mais il y a aussi un effet direct inactivateur du Ca^{2+} sur le canal. L'implication de la CaN dans la modulation des IP_3R est à la fois directe et indirecte,

soit par la déphosphorylation du récepteur et son expression (Klee *et al.*, 1998). Conjointement à CaMKII, l'entrée de Ca^{2+} provoquée par l'activation des récepteurs NMDA activera la CaN. Par contre, l'enzyme inhibe ensuite les GABA_A et les récepteurs Kainate, un sous-type de récepteurs au glutamate (Dingledine *et al.*, 1999). La CaN est également impliquée dans une rétroaction négative pour les récepteurs NMDA en diminuant le temps d'ouverture du récepteur-canal. Contrairement à la PKC, la CaN diminue la conductance des RyR alors que la Na^+/K^+ ATPase est activée par la CaN (directement et indirectement via DARP32, une phosphoprotéine régulée par l'AMPC et la dopamine) (Gordjani *et al.*, 2000; Perrino & Soderling, 1998; Hemenway & Heitman, 1999).

« Inhibitor-1 » et DARP32 sont des protéines qui inhibent la phosphatase PP1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire lorsque activées par PKA. Or, la déphosphorylation de « inhibitor-1 » par CaN inactive cette protéine, ce qui relève son effet inhibiteur sur PP1. Par conséquent, la CaN active PP1, mais de façon indirecte (Perrino & Soderling, 1998; Hemenway & Heitman, 1999).

Section E : Justification et objectifs

Les canaux Cl_{Ca} jouent un rôle prépondérant dans la dépolarisation et la contraction des cellules musculaires lisses vasculaires et, par conséquent, dans le tonus vasculaire en réponse à des hormones et des neurotransmetteurs vasoconstricteurs. L'identité moléculaire du gène codant pour Cl_{Ca} n'étant pas encore définie, la caractérisation de ces canaux est limitée aux cellules natives. L'affinité du canal pour le Ca^{2+} a été évaluée dans certains tissus (trachée, cellules acinaires) (Arreola *et al.*, 1996; Giovannucci *et al.*, 2002; Wang & Kotlikoff, 1997b) mais peu de données sont disponibles sur le muscle vasculaire (Pacaud *et al.*, 1992). De plus, la disparité entre les différentes techniques utilisées pour étudier Cl_{Ca} rend la comparaison entre les différents tissus et espèces plus difficile. De même, peu d'informations sont disponibles sur Cl_{Ca} malgré les différences entre les types vasculaires (artère et veine) et leurs fonctions. Par exemple, la veine porte de lapin a la particularité de présenter des potentiels d'action, l'artère pulmonaire principale est une artère de gros calibre ayant pour but d'amener le sang vers les artères pulmonaires secondaires et artérioles irrigant les poumons alors que les artères coronaires régulent l'apport sanguin au muscle cardiaque. Il est postulé que *les propriétés biophysiques, fonctionnelles et régulatrices de Cl_{Ca} diffèrent entre les myocytes de la veine porte, des artères pulmonaires et coronaires de lapin.*

Donc, les objectifs spécifiques de la première partie de cette étude seront :

- **Comparer l'expression fonctionnelle entre les trois tissus vasculaires** en utilisant trois méthodes différentes pour étudier Cl_{Ca} , soit en configuration « patch-perforé » avec amphotéricine B ou nystatine (300 $\mu\text{g/ml}$) : 1) l'utilisation du courant Ca^{2+} ou 2) de la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS par la caféine, soit 3) par la dialyse en configuration « cellule entière » d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fixe et connue.
- **Évaluer les propriétés biophysiques de Cl_{Ca} de myocytes artériels et veineux** en procédant à la dialyse cytoplasmique d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fixe et connue.
- La même technique sera également utilisée afin d'évaluer la **dépendance au Ca^{2+} de Cl_{Ca} de myocytes d'artères coronaires de lapin.**

L'étude des rôles physiologiques de Cl_{Ca} requiert l'utilisation d'outils pharmacologiques. Or, Piper *et al.* (2002 et 2003) ont démontré récemment que certains inhibiteurs des Cl_{Ca} , et particulièrement l'ANF, auraient la propriété surprenante d'activer ces mêmes canaux sur des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire de lapin lorsqu'ils sont en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevée fixe (Piper & Greenwood, 2003; Piper *et al.*, 2002). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire ont mis en évidence un phénomène similaire au niveau des myocytes coronaires de lapin. Bien qu'intéressants et nouveaux, les résultats de Piper *et al.*

(2002) ont offert peu d'information sur la dépendance temporelle de l'état stimulé des Cl_{Ca} par l'ANF et comment celle-ci est influencée par le potentiel transmembranaire. De plus, la dépendance de la stimulation en fonction de la concentration de l'ANF n'a pas été examinée par ce groupe. Nous pensons qu'une meilleure compréhension de ce phénomène pourrait fournir des informations essentielles sur le fonctionnement et éventuellement sur la structure moléculaire de ce canal. La stimulation par l'ANF des canaux Cl_{Ca} pourrait être utilisée comme signature dans la caractérisation moléculaire de la ou des protéines responsables de l'activité de ce canal au niveau des cellules natives, et possiblement fournir de l'information sur les protéines accessoires qui régulent le canal puisque la stimulation par l'ANF pourrait être causée par une interaction avec une protéine distincte du pore.

Donc, en procédant à la dialyse d'une solution contenant une $[Ca^{2+}]_i$ fixe et connue, les objectifs spécifiques de la seconde partie de cette étude seront :

- **Détecter l'effet stimulant de l'ANF sur les canaux Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses de l'artère coronaire de lapin et comparer ses propriétés avec celles rapportées au niveau des myocytes pulmonaires de la même espèce.**
- **Déterminer quantitativement les propriétés biophysiques et les dynamiques de ce phénomène** en utilisant un système de superfusion rapide qui permet une exposition contrôlée à l'ANF (temps et concentration).
- **Tenter de modéliser le phénomène de stimulation par l'ANF.**

Les canaux Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses semblent être activés directement par la liaison du Ca^{2+} à la protéine formant le canal (Piper & Large, 2003), tout comme le courant Cl^- de cellules sécrétrices de mammifère (Arreola *et al.*, 1996) et des oocytes de *Xenopus* (Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000). Ceci diffère des canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} des cellules épithéliales qui sont activés par une phosphorylation Ca^{2+} -dépendante via CaMKII (Fuller *et al.*, 1994). Par contre, des travaux récents suggèrent que Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses soient modulés par la phosphorylation. Dans les myocytes de trachée et d'aorte, $I_{Cl(Ca)}$ induit par la libération de Ca^{2+} contenu dans le RS récupère plus rapidement que le courant Ca^{2+} transitoire concomitant (Wang & Kotlikoff, 1997a; Hirakawa *et al.*, 1999). Toutefois, la différence entre les deux décours temporels ($I_{Cl(Ca)}$ et la libération Ca^{2+}) disparaît suite à l'inhibition de CaMKII (Wang & Kotlikoff, 1997a).

De plus, le rôle majeur de Cl_{Ca} dans le tonus vasculaire suppose une fine régulation de cette conductance comme le suggère également le phénomène de « rundown » en condition de « patch » excisé (Hirakawa *et al.*, 1999; Morris & Frizzell, 1993a). D'ailleurs, des études préliminaires au laboratoire ont suggéré une régulation de Cl_{Ca} de la veine porte de lapin par CaMKII (Leblanc & Lupien, 1997) alors que presque simultanément, Wang & Kotlikoff (1997) démontraient une inhibition de Cl_{Ca} par cette même enzyme (Wang & Kotlikoff, 1997a). Toutefois, aucune étude portant sur la régulation de ce canal dans le muscle lisse vasculaire n'a jusqu'à présent été réalisée (Wang & Kotlikoff, 1997a). Selon les résultats

préliminaires obtenus au laboratoire, il est postulé *qu'une phosphorylation par CaMKII devrait inhiber le courant Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses vasculaires.*

La phosphorylation des canaux Cl_{Ca} ou d'une protéine régulatrice par CaMKII implique que ces canaux soient régulés par au moins une phosphatase. Parmi les différents types de phosphatases, la calcineurine (CaN) est activée par le Ca^{2+} dans une gamme de concentrations physiologiques. De plus, la calcineurine est souvent associée à des fonctions similaires à CaMKII telles que la mémoire (Lisman *et al.*, 2002;Rongo, 2002;Perrino & Soderling, 1998) ou l'hypertrophie cardiaque (Zhu *et al.*, 2000;De Windt *et al.*, 2000). L'implication de cette phosphatase dans la régulation d'une conductance anionique, à l'exception du cerveau, est encore inconnue. Si une phosphorylation par CaMKII inhibe les canaux Cl_{Ca} , *une déphosphorylation par la CaN pourrait stimuler la conductance activée par le Ca^{2+} .* Par ailleurs, la CaN est un hétéromultimère où la sous-unité catalytique, la calcineurine A (CaNA) existe en trois isoformes différentes (α , β et γ) issues de gènes différents et ayant chacune des substrats distincts. Par conséquent, les objectifs principaux de ces troisième et quatrième parties de cette étude porteront sur les effets d'enzymes sensibles au Ca^{2+} , sur les propriétés biophysiques des canaux Cl^- activés par la Ca^{2+} et sur les mécanismes d'action impliqués.

En dialysant les myocytes avec une solution contenant une $[Ca^{2+}]_i$ fixe et connue, les objectifs spécifiques de ces troisième et quatrième parties seront :

- **Déterminer l'implication d'une phosphorylation par CaMKII sur le courant Cl_{Ca}** à l'aide du KN-93, un inhibiteur spécifique pour CaMKII, et un peptide inhibiteur (ARIP) hautement spécifique pour l'enzyme. De plus, la dialyse d'une forme constitutivement active de CaMKII sera introduite dans la pipette.
- En utilisant les mêmes techniques, **comparer l'action de CaMKII sur Cl_{Ca} des artères pulmonaire et coronaire et sur la veine porte de lapin.**
- **Déterminer l'implication d'une phosphatase dépendante du Ca^{2+} , la CaN, dans la modulation de Cl_{Ca}** à l'aide d'inhibiteurs pharmacologique (CsA) et peptidique (CaN-AF) de même que par la dialyse d'enzymes constitutivement actives.
- En utilisant des techniques immunocytochimiques et par la dialyse d'isoformes actives de la CaN, **déterminer si l'action de la CaN dépend de l'isoforme.**

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

<i>Isolation cellulaire</i>	94
<i>Électrophysiologie</i>	95
<i>Solutions et composés chimiques</i>	97
<i>Immunofluorescence et immunocytochimie</i>	100
<i>Immunobuvardage</i>	103
<i>Simulations informatiques</i>	103
<i>Analyses statistiques</i>	104

Isolation cellulaire

Les cellules musculaires lisses furent fraîchement isolées de la veine porte (VP), des artères coronaires descendantes gauches et circonflexes (AC) et des artères pulmonaires principales (AP) de lapin albinos New Zealand (2-3 kg). Les animaux ont été sacrifiés en utilisant une dose létale d'anesthésique (penthiobarbital) administrée via la veine de l'oreille (2 mg/kg) en accord avec les réglementations canadienne, américaine et britannique sur la manipulation des animaux. Suivant la dissection et l'excision du tissu conjonctif et adipeux, les tissus furent incubés dans une solution saline physiologique (SSP) contenant 50 μM CaCl_2 à 37 °C pendant 10 minutes (VP et AP) ou 10 μM CaCl_2 à la température de la pièce pendant 30 minutes (AC) pour ensuite être coupés en petits morceaux d'environ 1-2 mm. La veine porte était incubée dans du SSP (0 $[\text{Ca}^{2+}]_i$) contenant 0.3 mg/ml de protéase type VIII pendant cinq minutes suivi de 1 mg/ml de collagénase type II ou IA pendant 10 minutes. L'AP était incubée dans du SSP (0 $[\text{Ca}^{2+}]_i$) en présence 1 mg/ml de papaine, 0.15 mg/ml de dithiothréitol (DTT) et 2 mg/ml d'albumine de sérum de bovin (BSA) pendant 20 minutes à 35 °C ou à 4 °C pendant 12 heures. L'AC était exposée à du SSP (0 $[\text{Ca}^{2+}]_i$) contenant 1 mg/ml de collagénase de type 1A ou de type 2 et 0.05 mg/ml de protéase type XXVII pendant 20-25 minutes à 35 °C. Les différents protocoles d'isolation furent adaptés afin d'obtenir la plus grande qualité selon chacun des types vasculaires, ce qui explique l'utilisation de trois protocoles différents. Par contre, pour tous les tissus, suivant deux lavages dans du SSP, les cellules de chacun des tissus étaient dispersées par une douce agitation à l'aide d'une

pipette Pasteur de gros calibre dans du SSP. Les cellules furent entreposées à 4 °C et utilisées dans les six heures suivant l'isolation.

Électrophysiologie

Les expériences ont été réalisées à 30 °C ou à la température ambiante de la pièce (20-23 °C) tel qu'indiqué. Tous les courants ont été enregistrés à l'aide de la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière en utilisant le logiciel CED (Cambridge Electronic Design, Cambridge, G.-B.) et l'amplificateur List ou la série de logiciels pClamp (version 8.2) et l'amplificateur Axopatch-1D ou Axopatch-200A. Les micropipettes furent étirées avec une étireuse à micropipette et polies avec une microforge pour obtenir un embout d'environ 1 μm de diamètre et donc une pipette de résistance entre 2 et 4 $\text{M}\Omega$ tel qu'évalué avec les solutions II (Cs^+ et TEA) et B (0 K^+ et TEA). Pour certaines expériences avec la VP et l'AP (figures 3.A.2 et 3.C.2), les courants $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ furent enregistrés avec la technique de « patch-clamp » en configuration patch perforé (amphotéricine ou nystatine; 300 $\mu\text{g/ml}$, voir *Appendice I*) et furent induits par l'influx calcique via les canaux $\text{Ca}_{(\text{L})}$. Dans ce cas, les myocytes furent maintenus à -50 mV (AP) ou -70 mV (VP) et ensuite dépolarisés pour 50 ms à +10 mV (VP) ou 200 ms à +20 mV (AP) afin de provoquer l'ouverture des canaux $\text{Ca}_{(\text{L})}$. Le Ca^{2+} entrant par les canaux $\text{Ca}_{(\text{L})}$ activait ensuite les canaux Cl_{Ca} . Puisque les canaux $\text{Ca}_{(\text{L})}$ sont fermés par la repolarisation au potentiel de maintien, $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ était alors le courant entrant déclinant lentement suite à la repolarisation. Enregistrée à une fréquence de 2.5 kHz, l'amplitude de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fut évaluée comme la

moyenne de 2 points (1 ms) mesurés 50 ms suivant le début de la dépolarisation. La majorité des expériences avec les AP furent réalisées en présence d'une $[Ca^{2+}]_e$ 10 mM et en présence de Bay K 8644 (1 μ M) afin d'augmenter l'amplitude du courant Ca^{2+} . Pour les cellules de la VP, la $[Ca^{2+}]_e$ fut maintenue à 1.8 mM en la présence de 1 μ M Bay K 8644.

$I_{Cl(Ca)}$ fut également enregistré en utilisant la technique de « patch-clamp » en configuration cellule entière conventionnelle. Dans ce cas, la conductance anionique sensible au niveau de Ca^{2+} intracellulaire fut activée par la dialyse du milieu intracellulaire avec la solution de la pipette de « patch » laquelle contenait une concentration fixe et connue de Ca^{2+} libre. Plusieurs protocoles différents de voltage imposé furent utilisés. Les cellules furent maintenues à -50 mV, correspondant à une valeur près du potentiel membranaire basal des myocytes vasculaires (Nelson *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1977), et les caractéristiques voltage-dépendantes furent étudiées par une dépolarisation initiale à +70 mV ou +90 mV pour 1000 ms suivie d'une repolarisation à -80 mV pour 750 ms afin d'avoir un courant macroscopique de plus grande amplitude. La courbe exprimant la relation entre le courant enregistré et le potentiel imposé (courbe *IV*) fut réalisée en faisant des sauts de potentiels à partir du potentiel de repos (-50 mV) à des potentiels membranaires de -90 mV jusqu'à +150 pour 1500 ms. L'amplitude des courants était évaluée comme la moyenne de 5 points (5 ms, 1 kHz) immédiatement après le courant capacitif (\approx 30 ms suivant le début de la dépolarisation) pour la composante instantanée ou à la fin du saut de potentiel (1450 ms ou 950 ms suivant le début de la dépolarisation selon un saut de potentiel

dépolarisant de 1500 ou 1000 ms, respectivement) dans le cas de la composante soutenue.

Pour les expériences évaluant les effets dynamiques de l'ANF sur $I_{Cl(Ca)}$, un système de superfusion rapide était utilisé pour changer rapidement le milieu extracellulaire du myocyte. Le temps d'échange complet a été évalué comme étant inférieur à 300 ms en se basant sur des mesures de changement du potentiel de jonction d'une pipette de « patch » lors du passage d'une solution contenant du NaCl à une contenant du KCl. L'échange rapide des solutions externes était déclenché et contrôlé par ordinateur (Pentium II) avec un système d'acquisition Digidata 1200B (Axon Instruments Inc.) et le logiciel Clampex de la série pClamp (version 8.2).

Solutions et Composés Chimiques

Toutes les expériences en patch perforé se sont déroulées en présence des solutions internes et externes I et A décrites à l'*Appendice I*. Pour les autres expériences avec l'AP et certaines avec l'AC (tel qu'indiqué), les courants générés par l'activité des canaux Cl_{Ca} furent étudiés en utilisant la solution externe B et interne II décrites à l'appendice I. Les autres expériences avec l'AC furent réalisées avec les solutions externes C ou D, soit en utilisant le BAPTA (solution C) ou l'EGTA (solution D) comme chélateur calcique tel qu'indiqué dans les résultats. Les solutions de pipette utilisées pour ces expériences sont les solutions III ou IV, tel qu'indiqué. Les $[Ca^{2+}]_i$ furent ajustées à des niveaux fixes par addition des montants appropriés de $CaCl_2$ et de $MgCl_2$. Il est à noter que la $[Ca^{2+}]_i$ libre de ces solutions a été mesurée à l'aide d'une électrode sensible au Ca^{2+} (modèle 93-20, Thermo Orion,

Beverly, MA, USA) et de solutions de calibration (CALBUF-2, World Precision Instruments, Inc. Sarasota, FL, USA). Une très bonne corrélation entre les valeurs prédites par le logiciel WinMaxC (version 2.1; gratuit; <http://www.stanford.edu/~cpatton>) et les valeurs obtenues fut observée ($\Delta < 20\%$). Étant donné la proximité de ces valeurs, le fait qu'il était impossible de mesurer les solutions à 30°C (puisque les solutions de calibration étaient ajustées à +20°C) et que la composition de ces solution de calibration n'est pas la même que nos solutions, nous estimons justifié d'utiliser les valeurs calculées par WinMaxC. Puisque les propriétés de $I_{Cl(Ca)}$ et les effets induits par le KN-93 étaient quantitativement similaires, toutes les données expérimentales de AC pour les expériences avec le KN-93 réalisées à une même température furent mises en commun et exprimées en tant que pourcentage moyen du changement.

Pour les expériences ayant pour but d'évaluer le potentiel d'inversion du courant enregistré, le potentiel d'équilibre théorique du Cl^- fut déplacé vers des potentiels plus négatifs par le remplacement du NaCl extracellulaire par du NaSCN, le pore de Cl_{Ca} étant plus perméable aux ions SCN^- qu'aux ions Cl^- (≈ 5 fois). Le potentiel de jonction fut minimisé par l'utilisation d'un pont d'agar (contenant du NaCl) entre le bain et l'électrode de référence.

Toutes les enzymes furent achetées chez Sigma Chemical Company (St-Louis, MO, USA) à l'exception de la collagénase type 2 qui fut obtenue de Worthington (Lakewood, NJ, USA). L'acide niflumique (ANF), la nifédipine, la cyclosporine A et le fragment auto-inhibiteur de la CaN (CaN-AF) proviennent de Sigma Chemical Company alors que le Bay K 8644 et le KN-93 furent achetés de la

(ARIP) fut acheté chez Bachem Ltd (Norfolk, UK) et, tout comme le CaN-AF, était ajouté à la solution interne sous forme de poudre pour une concentration finale de 1 μ M (et de 5 μ M pour le CaN-AF). Les expériences furent réalisées avec la solution interne contrôle en alternance avec la même solution interne contenant le peptide.

La CaMKII et la CaNA (isoformes α et β) constitutivement actives furent gracieusement fournies par le Dr Brian Perrino (Université du Nevada, Reno, NV, USA). La sous-unité α de CaMKII du cerveau de rat fut exprimée dans la lignée cellulaire Sf9 infectée par le baculovirus en tant qu'enzyme tronquée et monomérique. L'enzyme fut ensuite convertie en sa forme constitutivement active par autothiophosphorylation en présence de calmoduline (6 μ M) et ATP γ S (0.4 mM) selon la méthode de Lledo *et al.* (Lledo *et al.*, 1995). L'autophosphorylation fut confirmée par immunobuvardage en utilisant un anticorps contre la CaMKII autothiophosphorylée. Les isoformes constitutivement actives furent générées par l'introduction d'un codon d'arrêt dans l'ADNc de la sous-unité catalytique (CaNA) causant ainsi la formation de sous-unités tronquées en carboxy-terminal du domaine de liaison à la CaM et éliminant ainsi le domaine d'auto-inhibition. Pour les expériences avec ces enzymes, les courants furent enregistrés sur plusieurs jours différents en utilisant la solution interne contrôle (500 nM $[Ca^{2+}]_i$) en alternance avec la même solution contenant la CaMKII autothiophosphorylée (30 nM) ou la CaN A α ou β (500 nM).

Immunofluorescence et immunocytochimie

CaN et CaMKII : Une période d'une heure à 37°C (5% CO₂) était allouée afin de permettre aux myocytes coronaires fraîchement isolés d'adhérer à des lamelles préalablement enduites de laminine (15 mg/ml; Sigma Chemical Co.). Les myocytes étaient initialement conservés dans la solution de dissection à faible [Ca²⁺] pour ensuite être incubés durant 15 minutes dans l'une des deux solutions suivantes :

1) une solution identique à la solution C (voir *Appendice I*) contenant 1.8 mM CaCl₂ à l'exception que le TEA était remplacé par du KCl (4.2 mM) et du KH₂PO₄ (1.2 mM) et 2) une solution qui permettait d'augmenter la [Ca²⁺]_i du myocyte afin de reproduire les conditions intracellulaires des expériences électrophysiologiques. Cette dernière solution contenait de l'ionomycine (80 nM) afin de perméabiliser la membrane au Ca²⁺ et la [Ca²⁺]_i était fixée à 1 µM à l'aide de 10 mM EGTA et des quantités appropriées de CaCl₂ et MgCl₂ calculées par le logiciel WinMaxC. Un inhibiteur de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK), le ML-7 (3 µM) était également utilisé afin d'empêcher la contraction des myocytes suite à la perméabilisation au Ca²⁺. Suivait alors l'étape de fixation des cellules au paraformaldehyde 3% (pH 7.3; fraîchement préparée) et la perméabilisation avec le triton X-100 0.2%. Après trois lavages de PBS, les myocytes étaient incubés dans 5% de Sérum Normal de Chèvre (SNC, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) et 2.5% de BSA pendant 30 minutes à la température ambiante de la pièce. Suivant des lavages au PBS, les cellules étaient incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-CaN (Sigma Chemical Co.) à une dilution de 1:200 et un anticorps polyclonal de lapin anti-CaMKII (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) à une dilution de 1:100 pour

une heure à la température ambiante de la pièce (23 °C). Les anticorps primaires étaient dilués dans du PBS contenant 2% de BSA et 1% de SNC. Des contrôles négatifs étaient réalisés en répétant les étapes précédentes mais en omettant les anticorps primaires. Les lamelles contenant les cellules étaient lavées trois fois avec du PBS et exposées à un anticorps anti-souris couplé au FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) à une dilution de 1:500 et un anticorps anti-lapin couplé au Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) à une dilution de 1:500 pendant une heure à la température ambiante dans une pièce sans lumière. Les anticorps secondaires sont originaires de la chèvre et dilués dans 2% de BSA et 1% de sérum normal de chèvre. Suivant trois lavages dans le PBS, les lamelles étaient installées sur des lames pour microscopes en utilisant du diazabicyclol [2.2.2] octane (DABCO) 0.2% dilué 1:1 dans du glycérol. Les myocytes coronaires étaient observés en utilisant un objectif à l'huile 60X (ouverture numérique=1.4) sur un microscope Axiovert 100M de Zeiss associé à un système de balayage confocal LSM510 équipé de logiciels d'acquisition et d'analyse d'images (Iena, Allemagne). Les lasers Argon (488 nm) et Hélium-Néon (633 nm) étaient utilisés pour observer les anticorps secondaires jumelés au FITC et Cy5, respectivement.

CaN $\text{A}\alpha$ et CaN $\text{A}\beta$: Ce protocole consistait à laisser les cellules musculaires lisses fraîchement isolées d'artères pulmonaires adhérer pendant une heure à 37°C (5% CO_2) à des lamelles préalablement enduites de laminine (15 mg/ml; Sigma Chemical Co.). Les myocytes étaient initialement conservés dans la solution de dissection à faible $[\text{Ca}^{2+}]$ pour ensuite subir un traitement semblable aux myocytes coronaires mentionnés ci-haut à l'exception que la $[\text{Ca}^{2+}]$ de la solution

externe était fixée à 500 nM. Suivait alors l'étape de fixation des cellules au paraformaldéhyde 3% (pH 7.3; fraîchement préparé) pendant 20 minutes à la température ambiante de la pièce (23 °C). Après trois lavages de PBS, les myocytes étaient incubés dans 5% de sérum normal d'âne (SNA; Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.) et perméabilisés avec le Triton X-100 0.2% pendant 45 minutes à la température ambiante de la pièce. Suivant des lavages au PBS, les cellules étaient incubées avec l'anticorps monoclonal de souris anti-CaN $\text{A}\alpha$ (Santa Cruz) à une dilution de 1:50 et un anticorps polyclonal de lapin anti-CaN $\text{A}\beta$ (Santa Cruz) à une dilution de 1:50 pour la nuit à +4 °C. Les anticorps primaires étaient dilués dans du PBS contenant 1% SNA et 0.04% Triton. Des contrôles négatifs étaient réalisés en répétant les étapes précédentes, mais en omettant les anticorps primaires. Les lamelles contenant les cellules étaient lavées trois fois avec du PBS et exposées à un anticorps anti-souris couplé au Cy5 (Molecular Probes) et un anticorps anti-lapin couplé au TriTC (Molecular Probes) à une dilution de 1:400 pendant une heure à la température ambiante dans une pièce sans lumière. Les anticorps secondaires sont originaires de la chèvre et dilués dans 1% SNA et 0.04% Triton. Suivant trois lavages dans le PBS, les lamelles étaient installées sur des lames pour microscopes en utilisant du diazabicyclol [2.2.2] octane (DABCO) 0.2% dilué 1:6 dans du glycérol. Les myocytes pulmonaires étaient observés en utilisant un objectif à l'huile 60X (ouverture numérique=1.4) sur un microscope Axiovert 100M de Zeiss associé à un système de balayage confocal LSM510 équipé de logiciels d'acquisition et d'analyse d'images (Iena, Allemagne). Les lasers Hélium-Néon (546 et 633 nm) étaient utilisés pour observer les anticorps secondaires jumelés au TriTC et Cy5, respectivement.

Immunobuvardage

Les myocytes d'artères pulmonaires étaient homogénéisés et 50 μ g du surnageant (centrifuge 1000 x g) fut séparé par SDS-PAGE 10% et électrotransféré sur des membranes de nitrocellulose. Les concentrations de protéines étaient déterminées par un test de Bradford utilisant la globuline γ de bovin comme référence. Les transferts étaient exposés aux anticorps primaires de chèvre anti-CaNA α ou anti-CaNA β (dilution 1:10 000), suivis par des anticorps de lapin anti-IgG de chèvre (dilution 1:50 000) conjugués à la peroxidase de raifort. L'immunodétection a été réalisée avec ECL Advance (Amersham) et les images (format TIFF) étaient assemblées avec un système d'imagerie équipé d'une caméra CCD (Labworks, UVP Inc.). Les images TIFF étaient ensuite analysées et traitées en utilisant Adobe Photoshop 4. La densitométrie a été réalisée en utilisant Un-Scan-It (Silk Scientific).

Simulations informatiques

L'interaction entre l'ANF et Cl_{Ca} a été simulée en utilisant des modèles cinétiques de la chaîne de Markov qui étaient résolus numériquement par le logiciel Axon Engineer (version 2.11c, Aeon Software Inc., Madison, WI, USA) sur un ordinateur Pentium III. Les simulations duraient jusqu'à 30 secondes et débutaient à un potentiel de maintien de -50 mV en condition non stationnaire. Des équations différentielles étaient résolues simultanément par la méthode d'intégration numérique Gear en utilisant un temps croissant de 10 μ s. Les paramètres spécifiques et les équations utilisées dans les simulations sont énumérés à l'*Appendice II*.

Analyses statistiques

Toutes les données sont exprimées en tant que moyenne de n cellules \pm s.e.m. Le logiciel Microcal Origin (version 5.0, Northampton, MA, USA) était utilisé pour établir les courbes et en estimer les paramètres alors que Statistica 99 pour Windows (version 5.5, Tulsa, OK, USA) était utilisé pour déterminer la différence statistique entre les moyennes individuelles en utilisant le test t de Student (paire ou non paire) ou une analyse de variance [simple (ANOVA) ou multiple (MANOVA) suivie d'un test *post-hoc* Fisher LSD pour mesures répétées] tel que spécifié dans le texte. $P < 0.05$ était considéré comme différent statistiquement.

Chapitre 3 : Résultats

<i>Section 3.A : Caractérisation du courant anionique des myocytes vasculaires</i>	106
<i>Section 3.B : Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin</i>	120
<i>Section 3.C : Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII</i>	142
<i>Section 3.D : Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels de lapin par la calcineurine</i>	161

Section 3.A - Caractérisation du courant anionique des myocytes vasculaires

Les courants Cl^- activés par le Ca^{2+} ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) des myocytes d'artères coronaires (AC), pulmonaires (AP) et de la veine porte (VP) de lapin furent enregistrés à l'aide de trois techniques différentes, soit 1) le « Ca^{2+} -Clamp », 2) l'influx calcique via les canaux Ca_{L} et 3) la libération du Ca^{2+} contenu dans le réticulum sarcoplasmique par une exposition à la caféine. Afin de minimiser la contamination du courant enregistré par la présence d'autres conductances (par exemple BK_{Ca}), toutes les expériences ont été réalisées en absence de K^+ et en présence d'inhibiteurs de canaux K^+ à la fois intracellulaire ($\text{TEA}=20 \text{ mM}$ et $\text{Cs}^+=20\text{-}126 \text{ mM}$) et extracellulaire ($\text{TEA}=5.4\text{-}10 \text{ mM}$) (voir *Chapitre 2 : Matériels et méthodes*). Le Ca^{2+} -Clamp est une méthode où le myocyte est dialysé avec une solution contenant un chélateur calcique (10 mM) tel que EGTA ou BAPTA à laquelle est ajoutée une quantité de Ca^{2+} suffisante pour obtenir une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{i}}$ libre entre 250 nM et $1 \text{ }\mu\text{M}$ (*Chapitre 2 : Matériels et méthodes*). Le courant $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ était stable trois à cinq minutes après l'obtention de la configuration cellule entière et demeurait stable pour toute la durée de l'expérience, soit plus de 20 minutes. Nos résultats montrent que le courant induit présente des caractéristiques dépendantes du potentiel membranaire semblables à celles présentées dans d'autres types cellulaires (par exemple : (Arreola *et al.*, 1996; Voets *et al.*, 1997)). Ainsi une dépolarisation supérieure à $+10 \text{ mV}$ induit un $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ présentant une activation lente alors que la repolarisation de la membrane provoque la fermeture lente des canaux Cl_{Ca} . Le courant $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ démontre donc des cinétiques lentes d'activation et de désactivation. Trois composantes de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ ont été mesurées, soit les

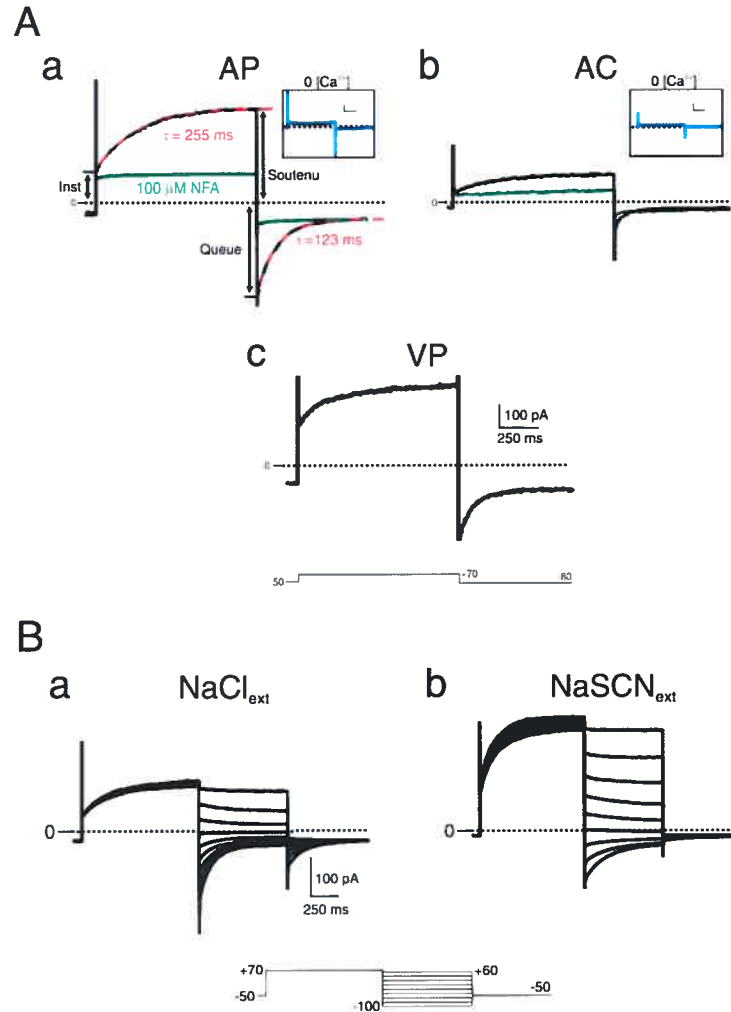


Figure 3.A.1 Caractérisation du courant anionique des cellules musculaires lisses artérielles et veineuses de lapin dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A. Exemple de tracés représentatifs enregistrés dans des myocytes d'artères pulmonaires (a), coronaires (b) et de la veine porte (VP; c) de lapin dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (témoin, trace noire) et présence de 100 μ M ANF (trace verte). Les courants furent induits par une dépolarisation (PM = -50 mV) de 1 seconde à +70 mV suivie d'une hyperpolarisation à -80 mV également d'une durée de 1 seconde. Les cinétiques d'activation et de déactivation à +70 et -80 mV, respectivement, du courant dans l'AP (Aa) suivent une relation exponentielle avec des constantes de temps respectives de 255 et 123 ms tel qu'illustré par les lignes pointillées. Le courant s'activant suite à une dépolarisation de la membrane est décomposé afin de faciliter son analyse en deux composantes identifiées en Aa, soit la composante instantanée (Inst) et soutenue (Soutenu). La composante instantanée est mesurée immédiatement après le courant capacitif alors que le courant soutenu est mesuré à la fin de la dépolarisation. Le courant de queue (Queue) est la composante identifiant le courant précédant sa déactivation provoquée par l'hyperpolarisation et est mesuré immédiatement suivant le courant capacitif de l'hyperpolarisation de la membrane. Les lignes pointillées noires indiquent le niveau de courant zéro. *Encarts.* Exemple de tracés représentatifs de courants induits par le même protocole mais enregistrés dans des myocytes dialysés avec $[Ca^{2+}]_i = 0$. L'échelle de ces encarts est de 100 pA et 250 ms. **B.** Ensemble de courants de myocytes d'artères pulmonaires induits en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ et baignés dans une solution externe témoin où le NaCl (NaCl; a) fut remplacé par du NaSCN (NaSCN; b). Les cellules furent initialement dépolarisées à +70 mV suivi de sauts de potentiel variants entre -100 et +60 mV avec des sauts de +20 mV. Les lignes pointillées noires indiquent le niveau de courant zéro. Tous les courants furent enregistrés en utilisant les solutions B et II (sauf panneau Bb) à 23 °C.

courants instantané et soutenu, et le courant de queue (figure 3.A.1-Aa). Alors que le courant instantané correspond aux canaux ouverts au potentiel de conditionnement (-50 mV), le courant soutenu représente la somme du courant instantané et du courant activé en fonction du temps par la dépolarisation de la membrane. Le développement de ce courant par la dépolarisation suit une trajectoire exponentielle (τ_{act}) tant dans les myocytes coronaires et pulmonaires que dans la veine porte (figures 3.A.1 et 3.A.2-B). La figure 3.A.1-A montre que, dans les trois types cellulaires étudiés, l'hyperpolarisation membranaire induit un courant entrant instantané (courant de queue, figure 3.A.1-Aa) suivi d'une baisse de courant selon une trajectoire exponentielle ($\tau_{\text{déact}}$) dans les trois types cellulaires évalués provenant de la fermeture des canaux. Les CML d'AC dialysées avec 500 nM ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ présentent des cinétiques d'activation et de désactivation semblables à celles enregistrées dans l'AP malgré le fait que le courant soit de plus faible amplitude dans les myocytes coronaires. D'autre part, l'exposition des myocytes d'AP, d'AC et de VP à l'ANF (100 μM) diminue le courant induit en présence de 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Notons qu'en absence de Ca^{2+} dans la solution de pipette (figure 3.A.1-A, *encarts*), aucun courant n'était enregistré lors de la dépolarisation ou de l'hyperpolarisation membranaire.

Lorsque le myocyte d'AP est dialysé avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$, bien que τ_{act} ne soit pas affecté par le potentiel membranaire, $\tau_{\text{déact}}$ varie en fonction du voltage à des potentiels négatifs avec une modification d'un ordre logarithmique népérien (e) pour un changement de 102 mV (données non présentées). De plus, le courant instantané et le courant soutenu présentent un potentiel d'inversion (E_{Inv}) près du potentiel d'inversion théorique des ions Cl^- (E_{Cl}) dans nos conditions expérimentales (-2 mV).

Toutefois, le E_{inv} des courants instantané et soutenu sont tous deux déplacés vers des valeurs plus négatives lorsque le NaCl externe est remplacé par le thiocyanate (NaSCN), un anion plus perméable. Par exemple, E_{inv} est passé de -5 ± 2 mV (n=6) en présence de NaCl à -43 ± 2 mV (n=6) lorsque la solution externe contenait le SCN (un exemple d'expérience est présenté à la figure 3.A.1-B). Il en était de même pour l'AC (-6 ± 1 mV (n=8) et -41 ± 6 mV (n=6) en présence de NaCl et NaSCN, respectivement) et pour la VP (-1 ± 2 mV (n=5) et -40 ± 6 mV (n=5) en présence de NaCl et NaSCN, respectivement).

Ces résultats suggèrent que le courant enregistré provienne de l'activité d'un canal perméable aux anions sensible à l'ANF qui présente des cinétiques d'activation et de désactivation typiques, une rectification sortante et est activé par la $[Ca^{2+}]_i$ lorsque les myocytes artériels et veineux sont dialysés avec 250, 500 nM ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ alors qu'aucun courant n'est enregistré en absence de Ca^{2+} . Ces caractéristiques distinctives de $I_{Cl(Ca)}$ ont précédemment été observées dans les cellules musculaires lisses (Large & Wang, 1996) et dans d'autres types cellulaires (Arreola *et al.*, 1996; Voets *et al.*, 1997; Nilius & Droogmans, 2002; Kuruma & Hartzell, 2000).

Malgré la grande similitude de $I_{Cl(Ca)}$ des trois préparations tissulaires, une différence importante fut observée lors des expériences précédentes. En effet, suite à la rupture de la membrane de patch, l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'AP et de VP diminuait rapidement allant même jusqu'à disparaître complètement à plusieurs reprises dans le cas de la VP. Ce phénomène de « run-down » ne fut pas observé dans les CML de l'AC, où une augmentation graduelle de $I_{Cl(Ca)}$ était enregistrée.

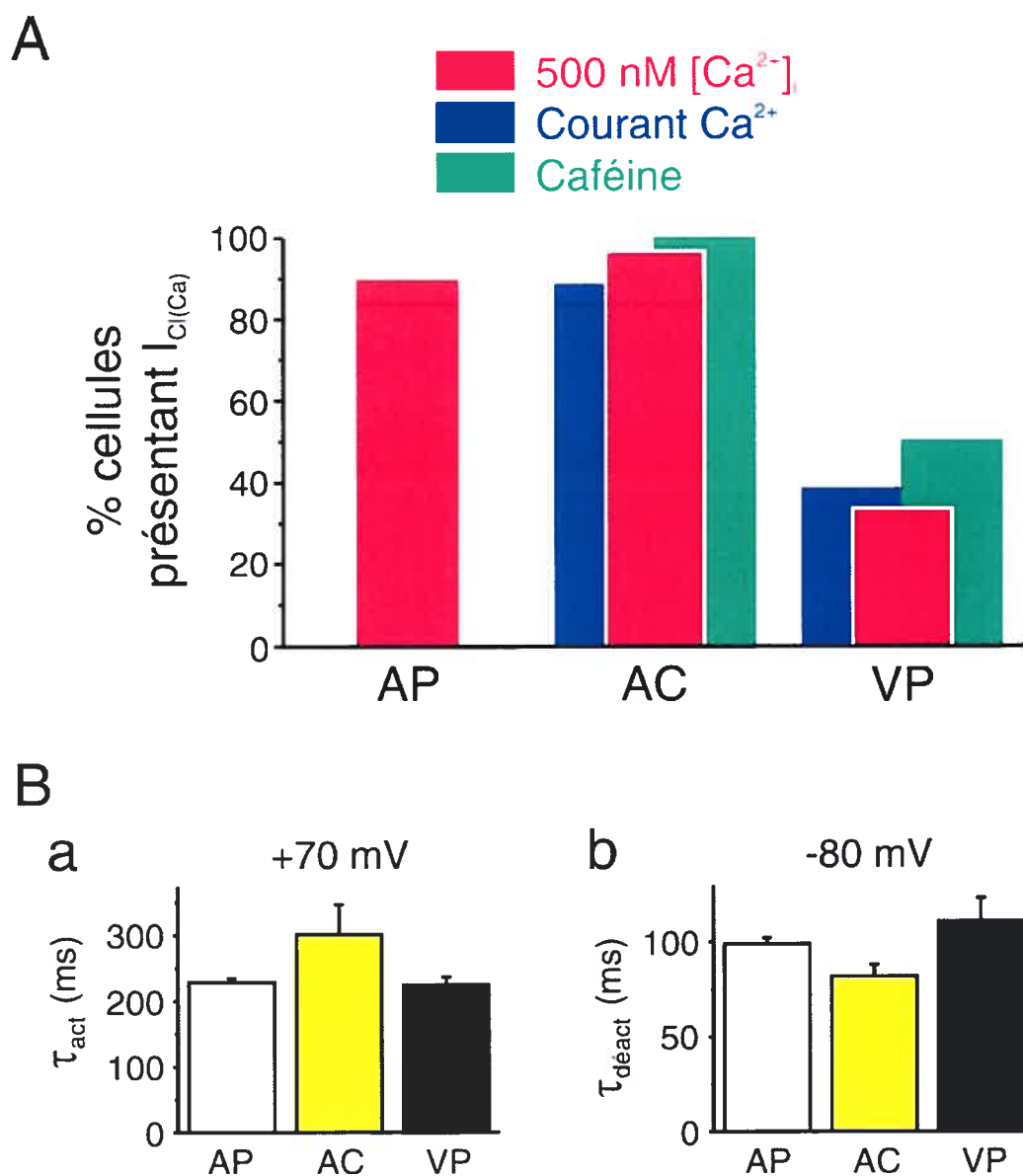


Figure 3.A.2 Comparaison de l'expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ chez les myocytes d'AP, d'AC et de VP de lapin

A. Histogramme rapportant le pourcentage de cellules pr  sant un courant Cl_{Ca} induit par une élevation fixe du niveau de Ca^{2+} intracellulaire (500 nM $[Ca^{2+}]_i$, avec les solutions B et II), influx Ca^{2+} via les canaux $Ca_{(L)}$ (Courant Ca^{2+} ; solutions A et I) ou la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS par l'exposition du myocyte à la caféine (5 mM) (Caféine, solutions A et I). Nombre total des expériences étudiées : AP, n=200; AC, 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, n=33; Courant Ca^{2+} , n=17; Caféine, n=18; VP, 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, n=403; Courant Ca^{2+} , n=55; Caféine, n=22. **B.** Histogramme rapportant les cinétiques d'activation (a) et de déactivation (b) moyennes à +70 mV et -80 mV, respectivement, de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'artères pulmonaires (AP; blanc), coronaires (AC; jaune) et de la veine porte (VP; noir) dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (n= 92, 4 et 47, respectivement). Toutes les expériences furent réalisées à 23   C.

L'expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ dans les cellules musculaires lisses de la veine porte et des myocytes artériels a donc été évaluée. L'expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ de la VP semble considérablement inférieure à l'AP et l'AC. De fait, en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, les cellules de la VP présentent un courant Cl^- avec des cinétiques d'activation et de désactivation dans seulement 131 des 403 cellules (43%) testées, comparativement à 180 des 200 myocytes (90%) pour l'AP et 32 des 33 myocytes (97%) de l'AC dans les mêmes conditions (figure 3.A.2-A). Afin de vérifier si cette différence d'expression fonctionnelle observée est due à l'altération du milieu intracellulaire par la dialyse de la cellule, l'expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ dans les trois préparations cellulaires a été évaluée à l'aide la technique de « patch-perforé », minimisant l'impact sur l'intégrité du milieu intracellulaire. Lorsque $I_{Cl(Ca)}$ est induit par la libération du Ca^{2+} contenu dans le RS par la caféine ou

Tableau 3.A.1 - Caractérisation du courant enregistré dans la veine porte et les artères coronaire et pulmonaire de lapin

Préparation cellulaire	Courant anionique activé par le $[Ca^{2+}]_i$	Sensibilité à l'ANF	Cinétiques (ms)		Expression fonctionnelle		
			τ_{act}	$\tau_{d\acute{e}act}$	« Ca^{2+} - Clamp »	$Ca_{(L)}$	Caféine
Veine porte	Oui	Oui	229 ± 6	99 ± 3	43%	50%	36%
Artère coronaire	Oui	Oui	302 ± 50	82 ± 6	97%	88%	100%
Artère pulmonaire	Oui	Oui	225 ± 10	111 ± 10	90%	n.e.	n.e.

τ_{act} et $\tau_{d\acute{e}act}$ évalués à +70 et -80 mV, respectivement; n.e. : non-évalué

par l'influx calcique via les canaux $Ca_{(L)}$ de VP, seulement 20 cellules sur un total de 55 (36%) et 11 de 22 myocytes (50%) présentent $I_{Cl(Ca)}$, respectivement. Par contre, $I_{Cl(Ca)}$ est enregistré dans 88% (15 de 17) et 100% (18 de 18) des myocytes coronaires où la stimulation de Cl_{Ca} a été initiée soit par l'influx calcique, soit par les réserves internes en Ca^{2+} . Par conséquent, bien que la VP présente un courant $I_{Cl(Ca)}$ dont les caractéristiques biophysiques sont en tout point semblables à celui présent dans les myocytes artériels, la proportion des cellules présentant un courant $I_{Cl(Ca)}$ est nettement inférieure dans le tissu veineux tel que résumé dans le tableau 3.A.1.

Puisque les myocytes artériels présentent une expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ semblable, une étude comparative du courant dans les deux tissus fut entreprise. Les courbes IV du courant anionique de cellules d'AP et d'AC furent donc déterminées en imposant, à partir d'un potentiel membranaire basal (PM) de -50 mV, un saut de voltage de 1.5 seconde entre -90 et $+130$ mV. Des exemples de tracés de courants représentatifs de myocytes d'AP et d'AC dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ sont présentés à la figure 3.A.3-Aa et b. Les panneaux Ba à d montrent les courbes IV moyennes pour les courants instantané (a et b) et soutenu (c et d) enregistrés en présence de 250 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules d'AP et de 500 nM ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ dans les cellules d'AC. Dans les deux types cellulaires, le courant induit démontre la même dépendance au voltage. De fait, les courbes IV du courant instantané présentent une très légère rectification sortante alors que le courant soutenu démontre une rectification sortante plus prononcée pour les deux types cellulaires. Notons toutefois que la rectification est plus prononcée dans les myocytes d'AP. En accord avec l'existence de courants Cl^- activés par le Ca^{2+} dans ces cellules,

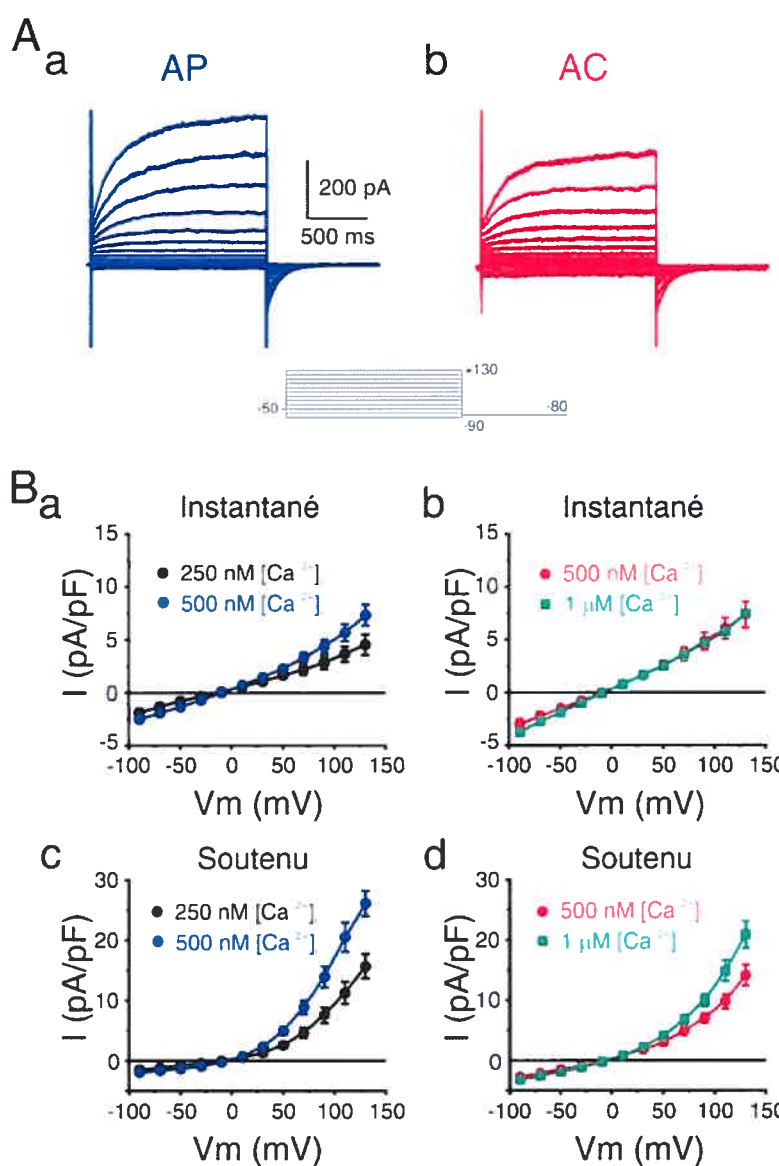


Figure 3.A.3 *Voltage- et Ca^{2+} -dépendance du courant anionique des myocytes artériels pulmonaires et coronaires*

A et **B** montrent le résultat d'expériences élaborées afin d'examiner la dépendance en fonction du potentiel des courants Cl^- induits de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires et coronaires. **A.** Famille de tracés représentatifs de courants induits dans des myocytes d'artères pulmonaires (a, bleu) et coronaires (b, rouge) dialysés avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. À partir d'un potentiel membranaire de -50 mV, un saut de 1.5 s de -90 à +130 mV fut appliqué à raison de sauts de +20 mV. **B.** Courbes *IV* moyennes illustrant le courant instantané (a, b) et soutenu (c, d) exprimé en densité de courant induit par un protocole identique à ce qui est présenté en A. Les myocytes d'artères pulmonaires (a et c) étaient dialysés avec une solution interne contenant 250 (cercles noirs, n=11) ou 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre (cercles bleus, n=10) alors que les cellules musculaires lisses d'artères coronaires (b et d) étaient dialysées avec 500 nM (cercles rouges; n=8) ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre (carrés verts; n=11). Toutes les expériences étaient enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

le courant enregistré était sensible aux changements de la $[Ca^{2+}]_i$. Par exemple, le courant soutenu de myocytes d'AP à +70 mV induit en présence de 250 et 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ était de 4.6 ± 0.7 et 9.0 ± 0.2 pA/p respectivement. Les cellules coronaires présentaient un courant instantané semblable en présence de 500 nM ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$, alors que le courant soutenu était significativement plus grand avec 1 μ M comparativement à 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ pour les potentiels supérieurs à +90 mV (figure 3.A.3-Bb et d). D'autre part, la comparaison des courants d'AP et d'AC en conditions identiques (500 nM $[Ca^{2+}]_i$) indique que les myocytes d'AP génèrent un courant supérieur aux AC, dû en grande partie au développement d'un courant de plus grande amplitude en fonction du temps durant la dépolarisation (figure 3.A.4-A et B) (14 ± 2 et 7.0 ± 0.8 pA/pF à +90 mV pour l'AP et l'AC, respectivement) alors que la composante instantanée du courant demeurerait virtuellement identique dans les deux préparations (4.4 ± 0.6 et 4.8 ± 0.8 pA/pF à +90 mV pour l'AP et l'AC, $n=10$ et 8, respectivement).

Ces résultats indiquent qu'en présence de $[Ca^{2+}]_i$ entre 250 nM et 1 μ M, un courant anionique soutenu présentant des caractéristiques semblables (composantes instantanées et activées en fonction du temps, rectification sortante, perméabilité anionique, sensibilité à l'ANF et activation par le Ca^{2+} intracellulaire) peut être induit dans la majorité des myocytes d'artères pulmonaires et coronaires. Ces courants partagent plusieurs propriétés avec les courants Cl^- activés par le Ca^{2+} enregistrés dans les cellules musculaires lisses (Large & Wang, 1996) et dans d'autres types cellulaires (Arreola *et al.*, 1996; Voets *et al.*, 1997; Kuruma & Hartzell, 2000).

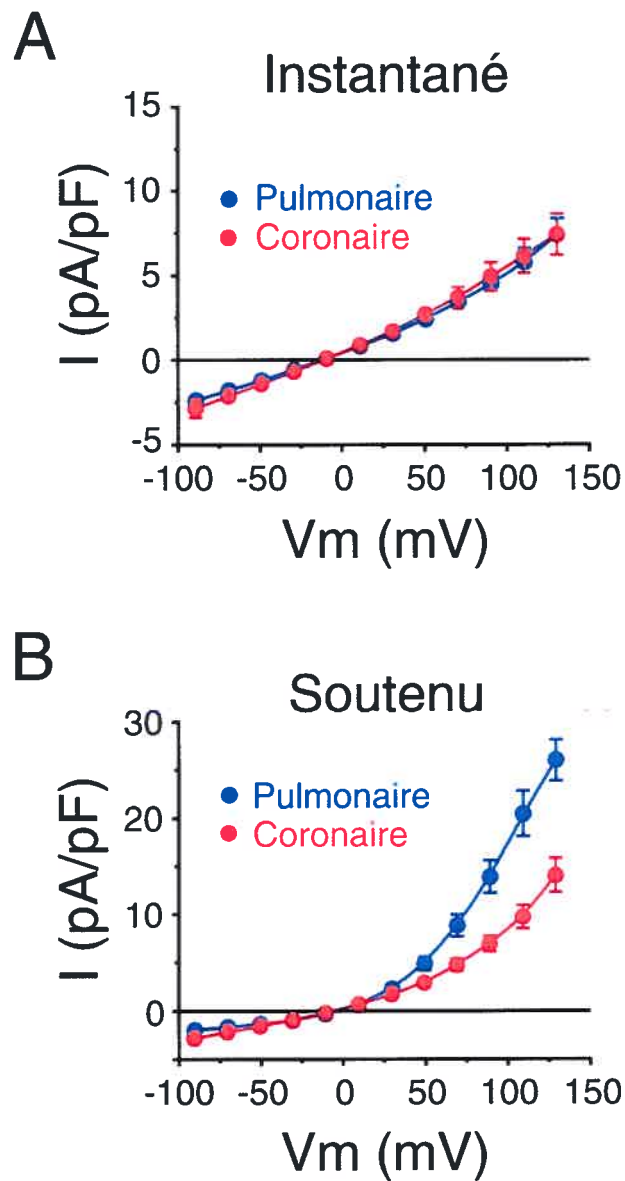


Figure 3.A.4 Comparaison de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'AP et d'AC dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A et B. Graphiques rapportant les relations entre le courant et le potentiel membranaire pour la composante instantanée (A) et soutenue (B) du courant enregistré d'AP (bleu, $n=10$) et d'AC (rouge, $n=8$) dialysé avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre et induit par un protocole identique à celui utilisé à la figure 3.A.3.

Dépendance au Ca^{2+} de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ de myocytes coronaires

Tel que précédemment démontré (figure 3.A.1-A), l'activation de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ nécessite la présence de Ca^{2+} dans le milieu intracellulaire. Nous avons donc entrepris d'évaluer la dépendance au $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ dans les myocytes coronaires avec la technique de Ca^{2+} -Clamp. Des cellules d'AC fraîchement isolées furent dialysées avec une solution contenant 10 mM EGTA sans ajout de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$) ou avec une concentration fixe de Ca^{2+} libre variant entre 350 nM et 1 μM (figure 3.A.5). Ces expériences se déroulant à $+30^\circ\text{C}$, les courants enregistrés à partir de cellules dialysées avec une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ supérieure ou égale à 350 nM présentent les mêmes caractéristiques (dépendance au potentiel membranaire et sensibilité à l'ANF), à l'exception de cinétiques plus rapides, que les courants précédemment mesurés à la température ambiante de la pièce (figure 3.A.3). Par contre, la dialyse d'une solution ne contenant pas de Ca^{2+} n'induit qu'un très faible courant qui ne présente aucune cinétique ni de dépendance au potentiel. Nous considérons par conséquent qu'il s'agit principalement d'un courant de fuite. L'utilisation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevées (500 nM et 1 μM) induit un courant d'amplitude semblable alors que le courant enregistré en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ faible est nettement inférieur (figure 3.A.5). La différence entre le courant induit à différentes $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est clairement illustrée aux figures 3.A.5-Ba et b où sont présentées les relations courant-potentiel membranaire (courbe IV) tant pour la composante instantanée que soutenue de $I_{\text{Cl(Ca)}}$. Tant à -60 mV qu'à $+50$ mV, le courant en présence de 350 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est inférieur à celui enregistré en présence de plus fortes $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mais est clairement supérieur au

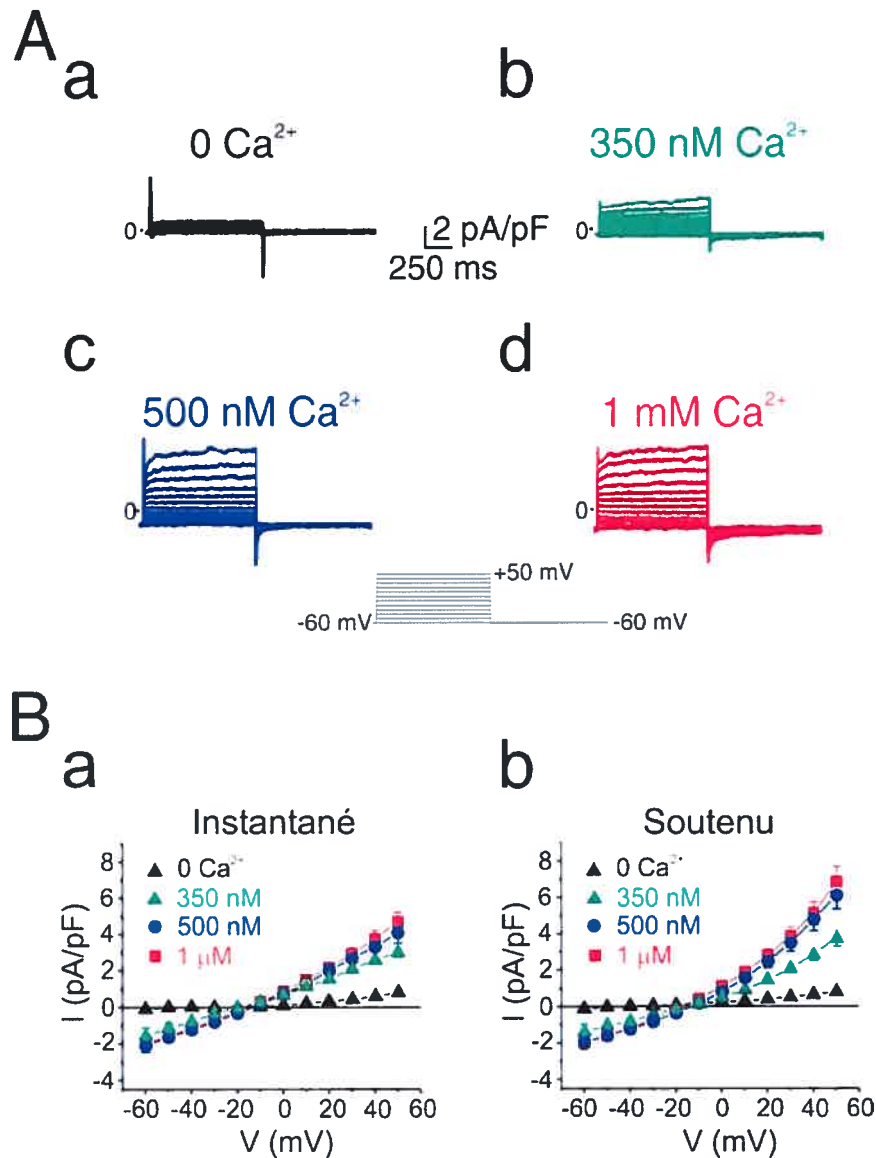
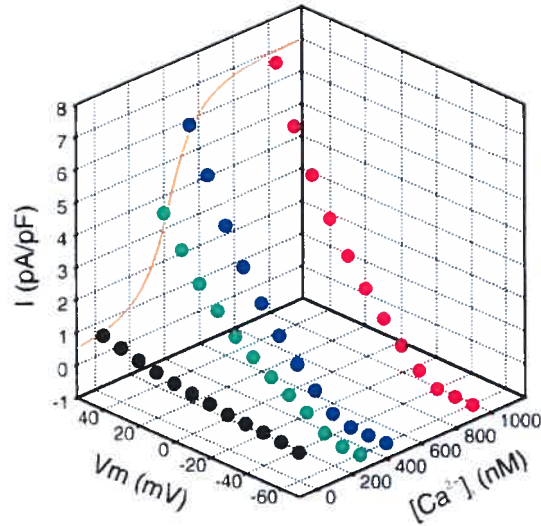


Figure 3.A.5 Courants $I_{\text{Cl(Ca)}}$ de myocytes d'AC dialysés avec une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre variant entre 0 et 1 μM

A. Familles représentatives de courants $I_{\text{Cl(Ca)}}$ induits dans des myocytes dialysés avec une solution contenant 10 mM EGTA et 0 Ca^{2+} (a, noir), 350 nM (b, vert), 500 nM (c, bleu) ou 1 μM (d, rouge) $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre. À partir d'un PM de -60 mV, des sauts d'une seconde de -60 à +50 mV furent appliqués à raison d'incrément de +10 mV tel qu'illustré. **B.** Courbes I/V moyennes pour le courant instantané (Ba) et soutenu (Bb) exprimé en densité de courant induit par des protocoles identiques à celui montré dans le panneau supérieur. Les myocytes furent dialysés avec une solution contenant 10 mM EGTA et 0 Ca^{2+} ajoutée (triangles noirs, $n=6$), 350 nM (triangles verts, $n=6$), 500 nM (cercles bleus, $n=28$) ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre (carrés rouges, $n=41$). Une analyse globale ANOVA pour les quatre conditions (différentes $[\text{Ca}^{2+}]_i$) a révélé un $P = 0.021$ et $P = 0.009$ pour les courants instantané et soutenu, respectivement. Les courants furent enregistrés à 30 °C et en utilisant les solutions D et IV.

A



B

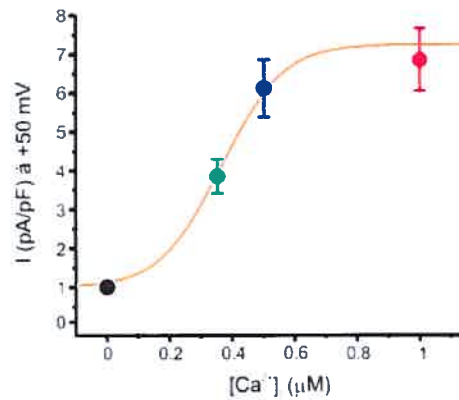


Figure 3.A.6 Relation entre $I_{Cl(Ca)}$ et la $[Ca^{2+}]_i$ du myocyte d'AC

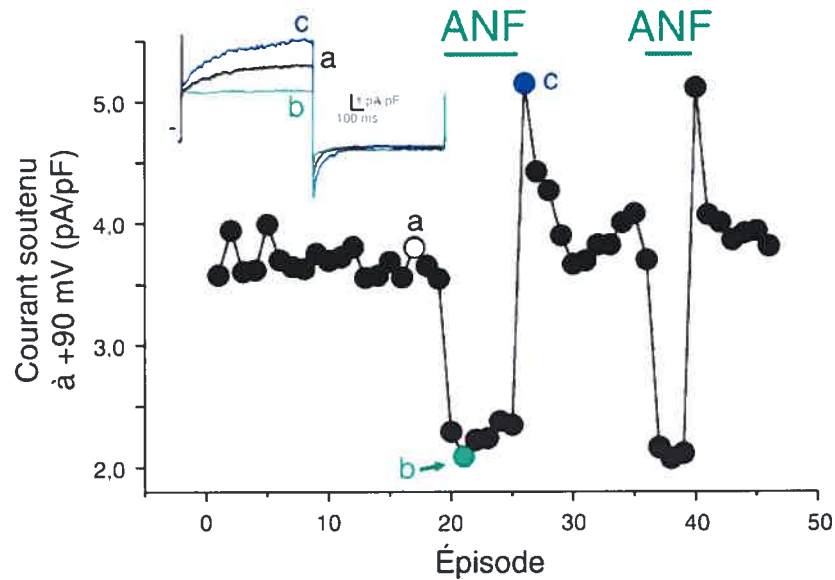
A. Graphique tridimensionnel représentant la composante soutenue du courant $I_{Cl(Ca)}$, enregistré à l'aide du protocole de la figure 3.A.5, de myocytes d'AC dialysés avec une solution interne contenant 10 mM EGTA et de 0 à 1 μM Ca^{2+} libre. La courbe sigmoïdale orange suit une fonction logistique (voir panneau B) pour les données du courant soutenu enregistré à $+50$ mV. **B.** Densité de courant soutenu à $+50$ mV tel que présenté en A. La courbe sigmoïdale orange suit la fonction logistique suivante : $y = (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^p] + A_2$ avec les paramètres suivants : $A_1 = 0.785$, $A_2 = 7.25$, $X_0 = 0.36 \pm 0.02$, $p = 4 \pm 1$ où A_1 et A_2 sont la densité de courant maximale et minimale en pA/pF, X est la concentration en Ca^{2+} libre (μM) et X_0 est la concentration en Ca^{2+} libre (μM) menant à l'activation semi-maximale du courant par le Ca^{2+} intracellulaire.

courant enregistré en absence de Ca^{2+} . De plus, les courbes *IV* des composantes instantanée (figure 3.A.5-Ba) et soutenue (figure 3.A.5-Bb) de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ mesurés en présence de 500 nM ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sont virtuellement identiques. Afin de mieux visualiser la relation entre Cl_{Ca} et $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et le potentiel membranaire, un graphique tridimensionnel de la relation entre le courant soutenu, le potentiel membranaire et la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est représenté à la figure 3.A.6-A. Une courbe dose-réponse à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ obtenue à partir d'une relation sigmoïdale pour les composantes soutenues des courants enregistrés à +50 mV est présentée (figure 3.A.6-B). La fonction logistique décrite à la figure a été utilisée et plusieurs paramètres ont été définis. Dans nos conditions, l'amplitude du courant de fuite (A_1 ; $[\text{Ca}^{2+}]_i = 0$) a été évaluée à 0.785 pA/pF alors que la densité de courant attribuée à $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ saturante (A_2) a été évaluée à 7.25 pA/pF. Également, l' EC_{50} de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ pour le calcium fut obtenue ($X_0 = 363 \pm 20$ nM). Notons que selon ces données, une contribution d'au moins quatre ions Ca^{2+} est suggérée par la pente de la relation sigmoïdale pour atteindre une stimulation maximale du $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par le Ca^{2+} ($p = 4 \pm 1$).

Section 3.B - Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin

Tel que démontré précédemment, une cellule musculaire lisse d'artère coronaire de lapin dialysée avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ présente un courant caractérisé par des cinétiques d'activation lorsque dépolarisée à +70 mV (PM= -50 mV) et de désactivation lorsque repolarisée à -80 mV en plus de démontrer une sensibilité à l'ANF. La figure 3.B.1-A présente l'effet de l'application de 100 μ M ANF à l'aide d'un système de perfusion rapide qui induit une inhibition très rapide des composantes instantanée et soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ de même que du courant de queue de $I_{Cl(Ca)}$ en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (voir l'encart). Suivant le retrait de l'ANF de la solution externe, l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ s'éleva à des valeurs supérieures aux valeurs témoins avec une augmentation moyenne de $50 \pm 8\%$, $73 \pm 15\%$ et $44 \pm 9\%$ pour les composantes instantanée, soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ et le courant de queue, respectivement ($n=11$). Ce phénomène transitoire suivant une brève exposition à l'ANF est fortement reproductible tout au long de l'expérience. De plus, lorsqu'une concentration supérieure d'ANF (1 mM) est utilisée, l'augmentation de l'amplitude du courant suivant le retrait de l'ANF semble supérieure à celle observée suivant l'exposition à 100 μ M ANF (figure 3.B.1-B). Par conséquent, l'accroissement de $I_{Cl(Ca)}$ suivant une exposition transitoire à l'inhibiteur pourrait être fonction de la concentration de ce dernier. Ceci démontre également que l'effet anormal de l'ANF sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence d'une concentration $[Ca^{2+}]_i$ constante préalablement démontré par Piper *et al.* (2002) sur des myocytes d'artère pulmonaire est également présent dans au moins un autre lit vasculaire, en l'occurrence, l'artère coronaire.

A



B

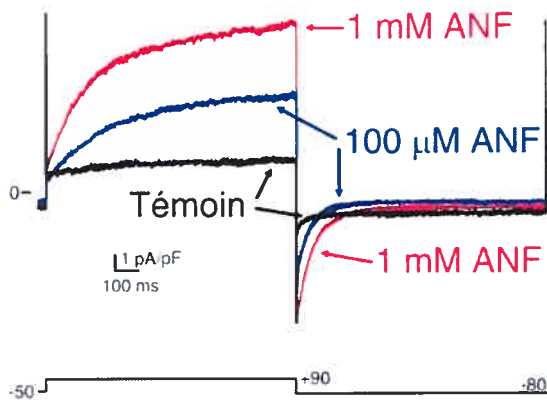


Figure 3.B.1 Stimulation du courant Cl^- activé par le Ca^{2+} par l'acide niflumique des myocytes coronaires de lapin dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre

A. Décours temporel de la composante soutenue du courant sortant enregistré à +90 mV à 10 s d'intervalle de cellules musculaires lisses coronaires dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre. L'acide niflumique (100 μ M; ANF) fut appliqué à l'aide d'un système de perfusion rapide pour la période indiquée par la ligne verte. Encart Exemple de tracés en absence (a; blanc), présence (b; vert) et suivant le retrait de 100 μ M ANF (c; bleu), respectivement. **B.** Protocole identique à celui utilisé en A (encart) et suivant le lavage de 100 μ M (bleu) et 1 mM (rouge) ANF dans une même cellule. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions D et IV à 23 °C.

De plus, le lavage de l'ANF affecte non seulement l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$, mais également les cinétiques du courant macroscopique produit par une dépolarisation et une hyperpolarisation en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Nos données montrent par exemple qu'une exposition transitoire à l'ANF accélère les cinétiques d'activation à +70 mV avec τ_{act} passant de 309 ± 50 ms en condition témoin à 187 ± 9 ms après l'exposition à 100 μ M ANF ($n=10$). La désactivation à -80 mV fut également modifiée puisque la constante de temps du courant de queue (τ_{deact}) qui était monoexponentielle (38 ± 2 ms) précédant l'exposition à l'ANF devint biexponentielle suivant le retrait du composé (193 ± 25 ms et 21 ± 2 ms, $n=10$) tel que présenté à la figure 3.B.2.

Dépendance de la stimulation et de l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ induite par l'ANF en fonction de la concentration

La dynamique des effets de l'exposition transitoire des myocytes d'AC à l'ANF sur $I_{Cl(Ca)}$ fut étudiée à l'aide d'un système de perfusion rapide contrôlé par ordinateur permettant de très brèves expositions au composé pharmacologique. Les expériences initiales visant à étudier les effets de l'ANF en fonction de la concentration et du temps furent réalisées sur des myocytes d'AC maintenus à un potentiel membranaire de +60 mV pendant 22 secondes. La figure 3.B.3 présente des exemples de tracés où les myocytes furent soumis à différentes concentrations (de 1 à 100 μ M et 1 mM) d'ANF pour différents temps d'exposition (de 2 à 10 secondes). Une courbe dose-réponse de $I_{Cl(Ca)}$ à l'ANF basée sur les résultats de ces expériences est présentée à la figure 3.B.4. Le pourcentage d'inhibition par l'ANF exprimé reflète le rapport entre l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ précédant l'exposition au composé et

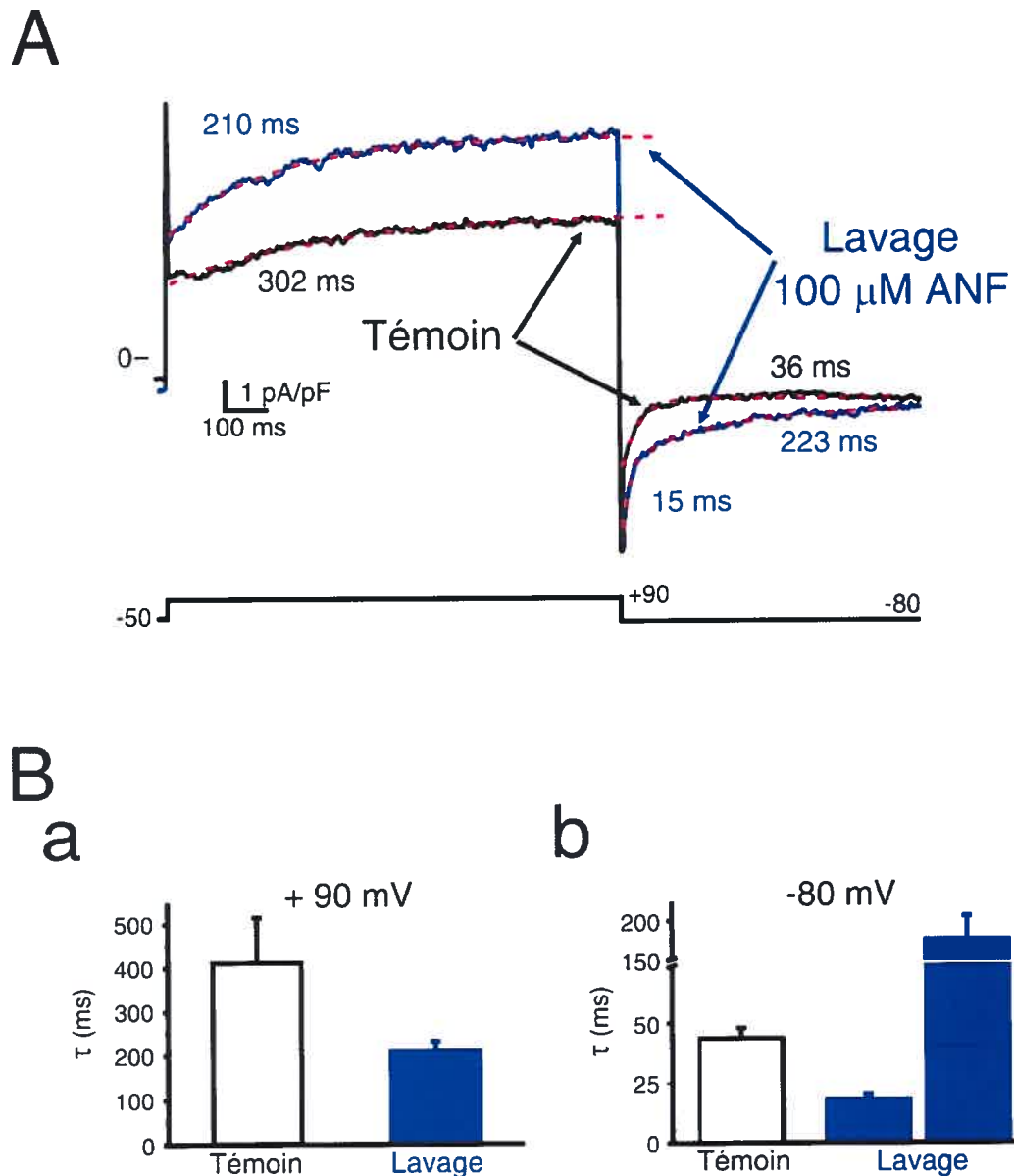


Figure 3.B.2 Effets du retrait de l'ANF sur les cinétiques d'activation et de déactivation de $I_{Ca(Ca)}$

A. Exemple de tracés du courant $I_{Ca(Ca)}$ induit par une dépolarisation à +90 mV (PM = -50 mV) suivi d'une hyperpolarisation à -80 mV en absence (contrôle; noir) et suivant le retrait de 100 μ M ANF (lavage; bleu). **B.** Représentation graphique des taux (τ) d'activation (a; +90 mV) et de déactivation (b; -80 mV) avant (contrôle; colonne vide) et suivant (lavage; colonne bleue) l'exposition à 100 μ M ANF d'expériences semblables à celles illustrées en A. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions D et IV à 23 °C.

immédiatement suite à l'application de l'ANF. De ces résultats, l' IC_{50} de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF a été déterminé dans les myocytes d'AC dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ ($IC_{50} = 117 \pm 10 \mu M$) à partir d'une relation sigmoïdale. Notons que selon ces résultats, même à des concentrations supérieures à 1 mM, l'inhibition maximale par l'ANF de $I_{Cl(Ca)}$ induit en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ à +60 mV serait de $64.5 \pm 0.9 \%$.

Toutefois, la plus faible concentration utilisée (1 μM) d'ANF ne provoqua qu'une inhibition partielle de $I_{Cl(Ca)}$ sans induire une stimulation quelconque du courant suivant le retrait de l'inhibiteur de la solution externe (l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ suivant le lavage relativement au courant précédant l'exposition à l'ANF était de 1.02 ± 0.02 , $n=11$). Par contre, l'exposition à de plus fortes concentrations (de 10 μM à 1 mM) suscita une augmentation de $I_{Cl(Ca)}$ comportant des propriétés complexes (figure 3.B.3). Alors que $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé déclina de façon monoexponentielle après avoir atteint une amplitude maximale après le lavage de 10 μM ANF (figure 3.B.3-B), la récupération du courant stimulé suivant le retrait de 100 μM ANF (figure 3.B.3-C) présente une composante rapide, semblable à celle observée après le lavage de 10 μM ANF, et une seconde phase qui décline plus lentement. Après le lavage de 1 mM ANF, le début de la stimulation était caractérisé par une réduction marquée de la composante rapide suivie par le développement lent de la phase de stimulation (figure 3.B.3-D). Contrairement à l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF, la stimulation relative (amplitude maximale du courant stimulé sur l'amplitude du courant précédant l'exposition à l'ANF) de $I_{Cl(Ca)}$ suivant le lavage de l'ANF ne semble pas varier en fonction de la concentration du composé utilisée (figure 3.B.5-A). Donc, suivant une exposition à 10 μM , 100 μM et 1 mM ANF pendant 2 secondes, l'amplitude du

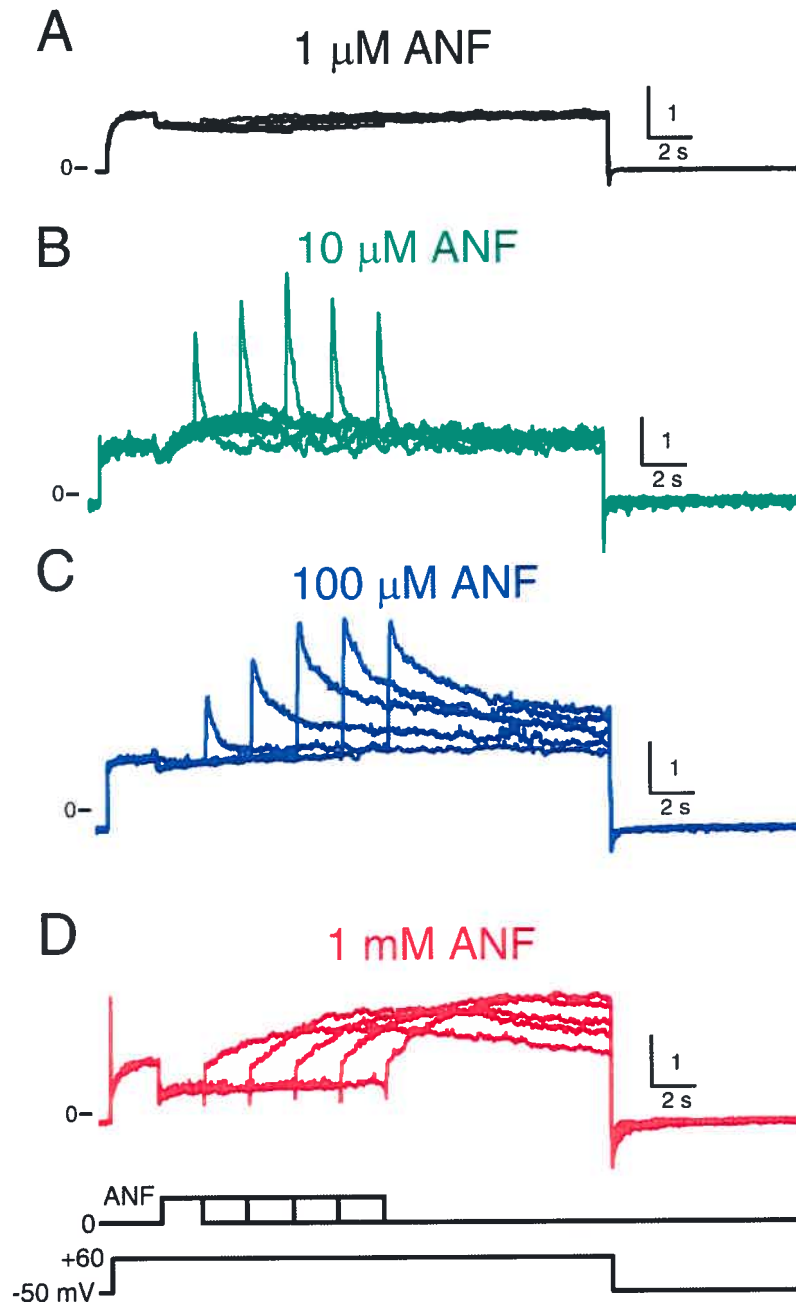


Figure 3.B.3 *Dynamiques du courant stimulé suivant le retrait de l'ANF en fonction de la concentration utilisée*

Exemple de tracés du courant I_{Ca} induit par un saut dépolarisant de 22 secondes à +60 mV (PM = -50 mV) suivi d'une repolarisation à -50 mV pendant 8 secondes et ce protocole fut répété toutes les 60 (A, B et C) ou 90 secondes (D) tel qu'illustré au bas de la figure. Deux secondes suivant le début du saut de potentiel dépolarisant, 1, 10, 100 μ M ou 1 mM ANF (A, B, C et D, respectivement) fut appliqué pour une durée de 2 à 10 secondes en utilisant un système de superfusion rapide contrôlé par ordinateur. Le courant I_{Ca} est exprimé en rapport au courant enregistré précédant l'application d'ANF. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions D et IV à 23 °C.

courant fut augmentée de 1.9 ± 0.3 , 2.1 ± 0.3 et 2.0 ± 0.2 fois, respectivement ($n=7$). De plus, le fait d'augmenter le temps d'exposition ne semble influencer aucunement la stimulation maximale relative observée suivant le lavage de l'ANF (figure 3.B.5). Cependant, les cinétiques complexes de la stimulation suggèrent un effet dépendant de la concentration. Une analyse approfondie démontre que l'intervalle entre le retrait de l'ANF et l'amplitude maximale de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé augmente proportionnellement à la concentration d'ANF utilisée tel que le démontre la figure 3.B.5-B (voir aussi l'encart). Le délai pour atteindre l'amplitude maximale de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé augmente significativement de 270 ± 30 ms suivant le lavage de $10 \mu\text{M}$ ANF à 600 ± 200 ms et 7 ± 1 s suivant le lavage de $100 \mu\text{M}$ et 1 mM ANF, respectivement ($n=7$). La durée

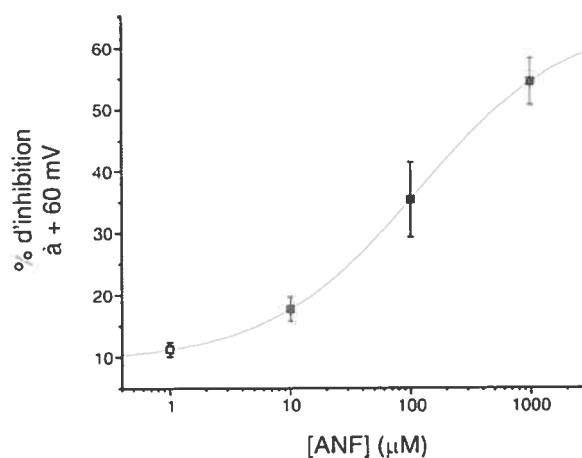


Figure 3.B.4 Courbe dose-réponse de l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF.

Pourcentage d'inhibition du courant à +60 mV par l'ANF enregistré lors d'expériences tel qu'illustré à la figure 3.B.4. La courbe sigmoïdale orange suit la fonction logistique suivante : $y = (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^p] + A_2$ avec les paramètres suivants : $A_1 = 9.4 \pm 0.8$, $A_2 = 64.4 \pm 0.9$, $X_0 = 117 \pm 13$, $p = 0.78 \pm 0.05$ où A_1 et A_2 sont les pourcentages d'inhibition maximal et minimal, X est la concentration d'ANF (μM) et X_0 est la concentration d'ANF (μM) menant à l'inhibition semi-maximale du courant par le composé.

de la stimulation du courant est également proportionnelle à la concentration d'ANF utilisée (figures 3.B.3 et 3.B.5-C). Nos résultats montrent que le temps que prend $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé pour revenir à 50% de l'amplitude de l'augmentation augmente de 450 ± 30 ms suivant le lavage de 10 μ M ANF à 740 ± 80 ms et 14 ± 1 s suivant le retrait de 100 μ M et 1 mM ANF, respectivement. Le temps d'exposition ne semble toutefois pas influencer ni le délai pour atteindre l'amplitude maximale ni le taux de récupération du courant stimulé. Ces résultats suggèrent que la stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF présente des dynamiques complexes et que certaines composantes varient en fonction de la concentration d'ANF utilisée.

Dépendance au potentiel de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé

Nous avons ensuite tenté de déterminer la dépendance au potentiel de la stimulation et de l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF en présence d'une $[Ca^{2+}]_i$ libre fixe. Dans cette série d'expériences, les myocytes furent exposés à 100 μ M ANF et maintenus à différents voltages, soit -60, +20, +60 et +90 mV à partir d'un potentiel membranaire de maintien de -50 mV (figures 3.B.3-C et 3.B.6). L'influence du potentiel sur l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF a donc été évaluée à partir de ces expériences. Le pourcentage d'inhibition exprimé à la figure 3.B.7 a été évalué de la même façon que pour la courbe dose-réponse (figure 3.B.4). Une régression linéaire démontre la faible dépendance de l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF (24 ± 9 % d'inhibition pour un changement de 100 mV). Les expériences démontrèrent également que l'amplitude relative (amplitude maximale en valeur absolue du courant stimulé sur l'amplitude du courant en valeur absolue précédant l'exposition à

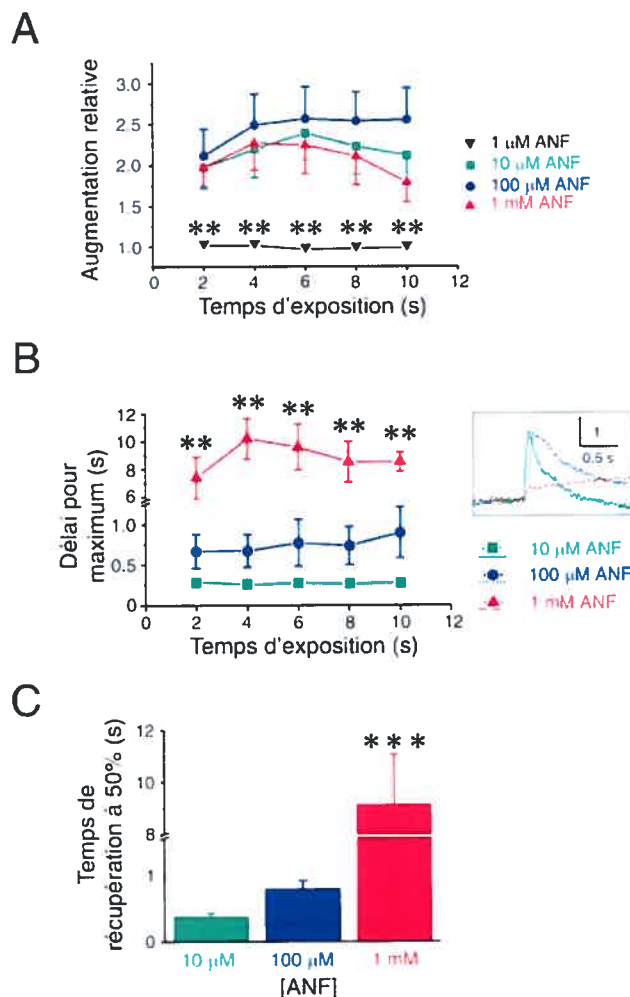


Figure 3.B.5 Corrélation entre la concentration d'ANF et les dynamiques de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé par le retrait de l'inhibiteur

A. Diagramme rapportant l'augmentation relative moyenne de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes coronaires induits par le lavage de l'ANF (1, 10, 100 μ M ou 1 mM, $n=11$, 7, 7, 7 et 7, respectivement) calculé à partir de l'amplitude maximale du courant à +60 mV suivant le retrait de l'ANF normalisé à la valeur du courant précédant l'application d'ANF (de 2 à 10 secondes) tel que décrit à la figure 3.B.3. L'analyse statistique ANOVA pour mesures répétées a révélé une différence significative entre les groupes avec $P < 0.01$. **B.** Graphique représentant le délai entre le retrait du composé et l'amplitude maximale de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé suivant le lavage de l'ANF (10, 100 μ M et 1 mM, $n=7$, 7 et 7) après exposition du myocyte pendant 2 à 10 secondes. *Encart* Agrandissement d'exemples de traces du courant relatif de cellules exposées à 10, 100 μ M et 1 mM ANF pendant 2 secondes afin d'illustrer l'augmentation du délai pour atteindre l'amplitude maximale de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé en fonction de la concentration d'ANF. L'analyse statistique ANOVA pour mesures répétées a révélé une différence significative entre les groupes avec $P < 0.001$. **C.** Histogramme représentant les cinétiques moyennes de récupération de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé de cellules exposées à 10, 100 μ M et 1 mM ANF pendant 2 secondes. Le temps de récupération fut évalué en tant que période requise pour $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé afin de diminuer de 50% par rapport à l'amplitude maximale. L'analyse statistique ANOVA simple révéla une différence significative entre les 3 groupes (10 μ M, 100 μ M et 1 mM) avec $P < 0.001$. ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$.

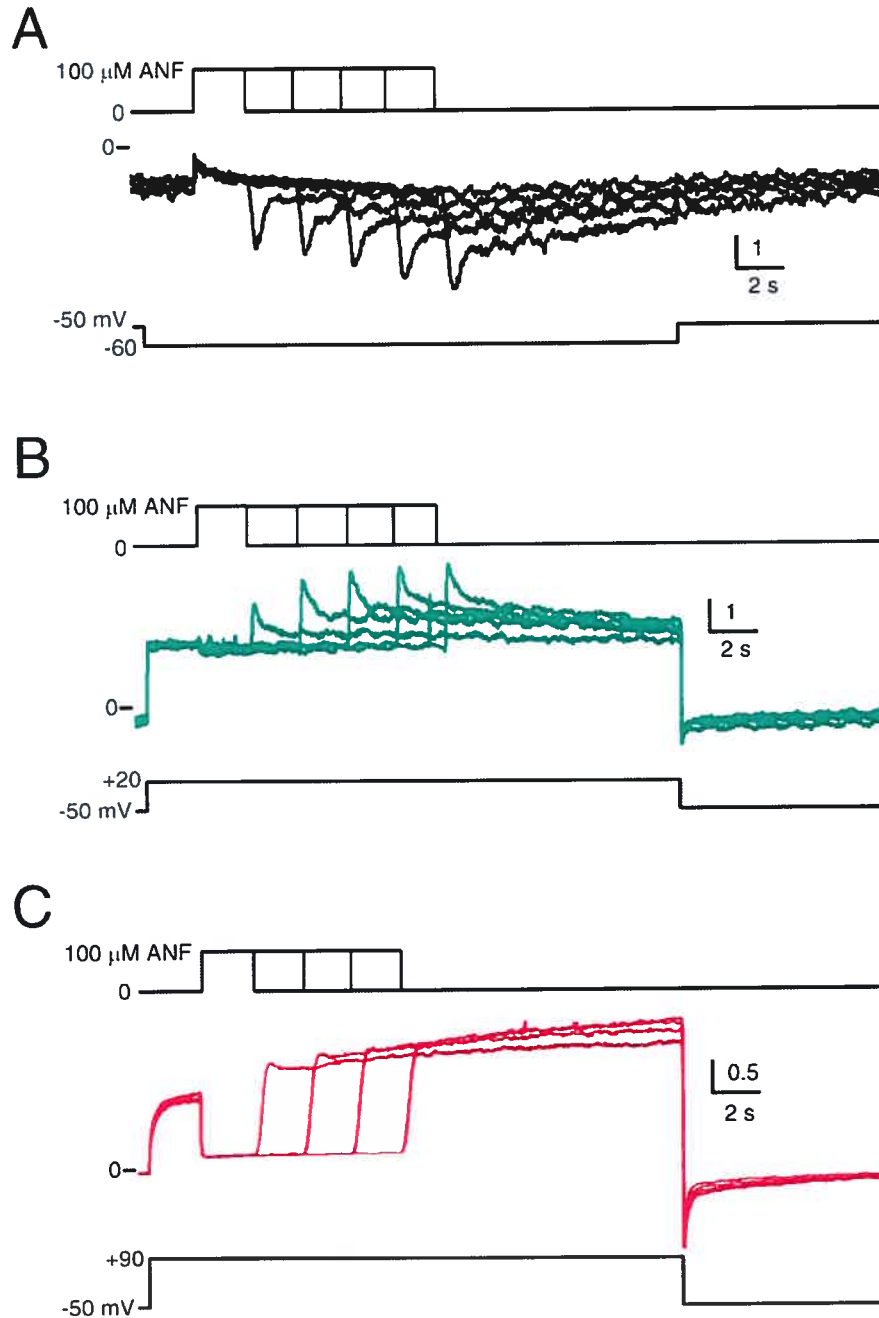


Figure 3.B.6 Potentiel membranaire et dynamiques de $I_{Ca(Ca)}$ -stimulé par le retrait d'ANF

A. Exemple de tracés de $I_{Ca(Ca)}$ relatif induit par un saut de potentiel de 22 secondes à -60 mV (PM = -50 mV) suivi d'un saut à -50 mV pendant 8 secondes à toutes les 60 secondes tel qu'illustré sous les tracés. Après 2 secondes, les cellules furent exposées à 100 μ M ANF pendant 2 à 10 secondes suivi du retrait très rapide de l'inhibiteur du milieu externe grâce à un système de perfusion rapide tel que représenté au-dessus des tracés. **B et C.** Les panneaux sont semblables au panneau A à l'exception que les cellules furent dépolarisées à +20 mV (B et C, respectivement) pendant 22 secondes tel qu'illustré sous les tracés. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions D et IV à 23 °C.

l'ANF) de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé suivant une exposition de 10 secondes ne varie pas entre les cellules maintenues à -60 mV et celles maintenues à des potentiels aussi positifs que $+90$ mV (figure 3.B.8-A). Des applications plus courtes (2-8 secondes) à l'ANF ont eu des effets semblables (données non présentées). Toutefois, une tendance, bien que statistiquement non significative, suggère que le délai pour atteindre l'amplitude maximale de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé augmente avec la dépolarisation membranaire (figure 3.B.8-B). Au cours de l'expérimentation à $+90$ mV aucune récupération significative de l'état stimulé de $I_{Cl(Ca)}$ ne fut observée (figure 3.B.7-C). Par conséquent, l'analyse du temps de récupération se révéla inadéquate pour évaluer le taux de récupération. Le calcul de l'aire sous la courbe du courant suivant le retrait de l'ANF (figure 3.B.8-C) fut donc utilisé afin d'illustrer le taux de récupération. Selon ces résultats, le taux

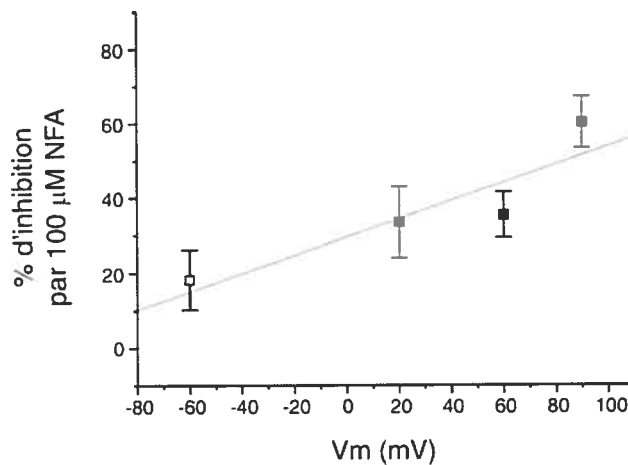


Figure 3.B.7 Influence du potentiel membranaire sur l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par l'ANF

Pourcentage d'inhibition du courant entre -60 et $+90$ mV par $100 \mu\text{M}$ ANF enregistré lors d'expériences tel qu'illustré à la figure 3.B.6. La droite orange décrit la fonction linéaire suivante : $y = A + B \cdot X$ avec les paramètres suivants : $A = 29 \pm 6$, $B = 0.24 \pm 0.09$ où A est le pourcentage d'inhibition à 0 mV, B est la dépendance de l'inhibition au potentiel membranaire et X est le potentiel membranaire (mV).

de récupération de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé est inférieur à des potentiels plus positifs.

Le courant stimulé par l'ANF est bien $I_{Cl(Ca)}$

Puisqu'il est possible que le courant induit par le retrait de l'ANF soit dû à un recrutement *de novo* de canaux autres que Cl_{Ca} précédemment silencieux plutôt qu'une modulation d'un canal Cl_{Ca} , les expériences suivantes furent entreprises afin de déterminer si le courant stimulé était également sensible à l'ANF. Une expérience représentative où le myocyte fut maintenu à +60 mV alors que l'ANF est appliqué pendant 2 secondes et ré-appliqué pour 2 secondes suivant 500 ms de lavage est représentée à la figure 3.B.9-A. Il est clair que le courant stimulé suivant le retrait de l'ANF est rapidement inhibé par une seconde exposition à l'ANF au même degré que $I_{Cl(Ca)}$ en condition témoin. Des résultats semblables furent observés dans trois autres cellules ainsi que par l'utilisation de 1 mM ANF (n=2). D'autres expériences furent également entreprises dans le but d'évaluer le potentiel d'inversion du courant enregistré suivant le retrait de l'ANF. Donc, 500 ms suivant l'exposition à 100 μ M ANF pendant deux secondes, une rampe de potentiel (de -50 mV à +50 mV en 250 ms) fut imposée (figure 3.B.9-B). Les potentiels d'inversion de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé obtenus de myocytes exposés à 100 μ M (-16 ± 2 mV, n=6) et 1 mM ANF (-19 ± 2 mV, n=4) ne sont pas significativement différents et sont près de la valeur théorique du E_{Cl} dans nos conditions (-21.1 mV). Ces résultats suggèrent que le courant stimulé par le lavage d'ANF est $I_{Cl(Ca)}$ et donc que cet inhibiteur présente à la fois des propriétés inhibitrices et stimulatrices sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes coronaires.

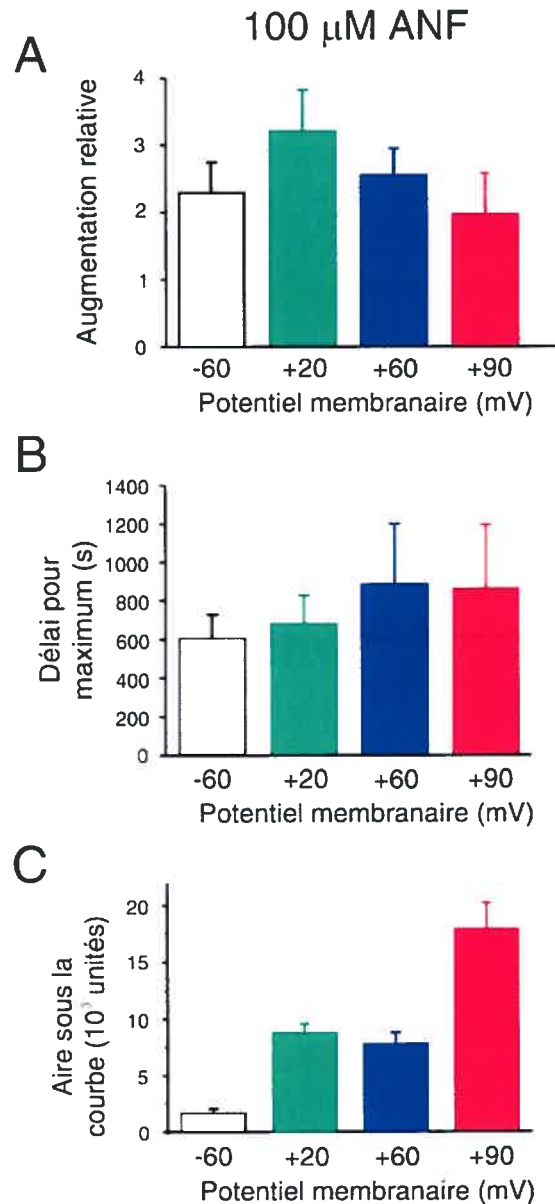


Figure 3.B.8 Quantification de la dépendance au potentiel de $I_{Ca(Ca)}$ -stimulé induit par le retrait de 100 μ M ANF

A. Représentation graphique de l'augmentation relative moyenne de $I_{Ca(Ca)}$ induite par le lavage de 100 μ M ANF de myocytes maintenus à -60, +20, +60 et +90 mV ($n=5, 5, 7$ et 5 , respectivement) calculée à partir de l'amplitude maximale du courant suivant le retrait de l'ANF normalisé à la valeur du courant précédant l'exposition à l'inhibiteur (10 secondes) sur les expériences réalisées telles que décrites à la figure 3.B.5. **B.** Graphique représentant le délai entre le retrait de l'ANF (100 μ M) et l'amplitude maximale de $I_{Ca(Ca)}$ -stimulé suivant le lavage du composé après exposition du myocyte pendant 10 secondes de myocytes maintenus à -60, +20, +60 et +90 mV ($n= 5, 5, 7$ et 5 , respectivement). **C.** Graphique illustrant la récupération de $I_{Ca(Ca)}$ -stimulé par le calcul de l'aire sous la courbe moyenne des traces normalisées suivant le retrait de 100 μ M ANF de myocytes maintenus à -60, +20, +60 et +90 mV.

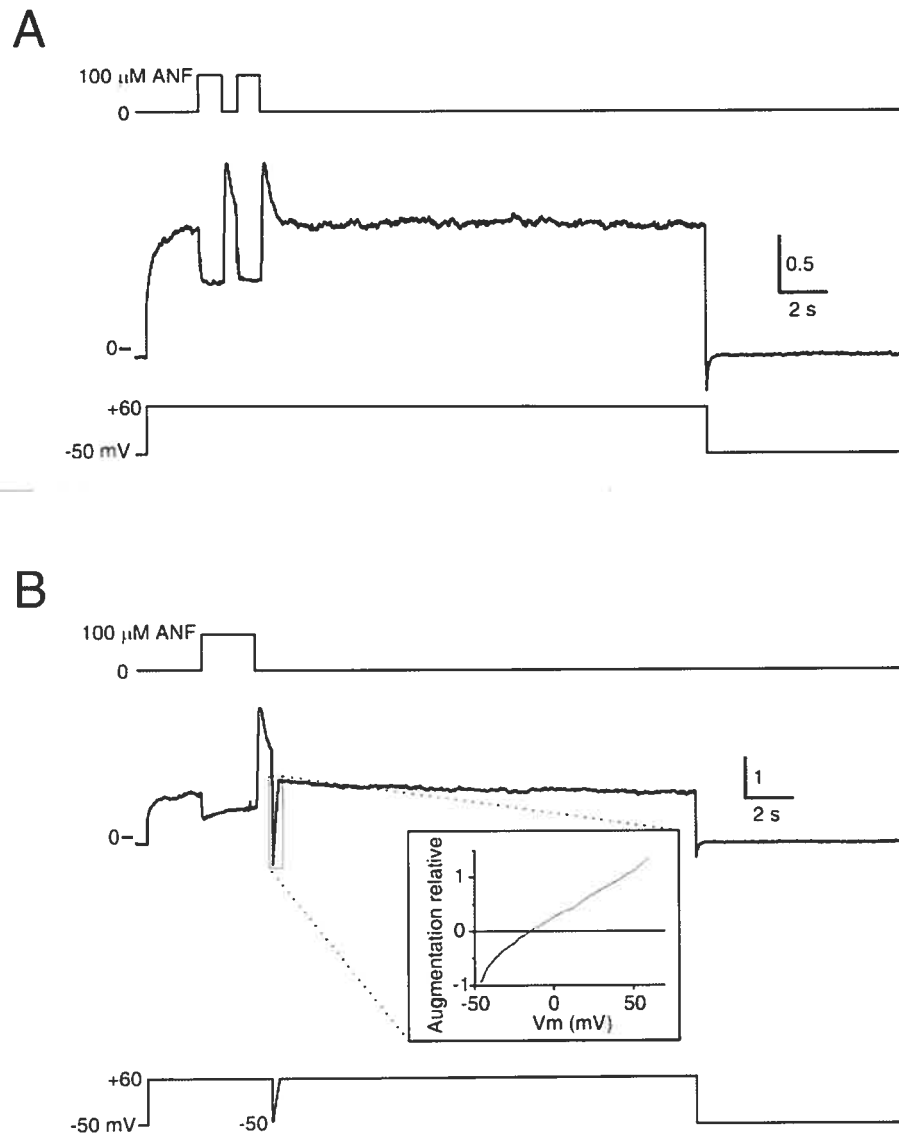


Figure 3.B.9 Propriétés de $I_{Ca(Ca)}$ -stimulé

A. Effet d'une exposition à 100 μ M ANF pendant 2 secondes sur $I_{Ca(Ca)}$ enregistré à +60 mV. Exemple de tracés de courant relatif induit par un saut de potentiel de 22 secondes à +60 mV (PM = -50 mV) suivi d'une repolarisation à -50 mV pendant 8 secondes tel qu'illustré sous la trace. Deux secondes suivant le début de la dépolarisation, les myocytes coronaires furent exposés à 100 μ M ANF pendant 1 seconde. 500 ms suivant le lavage de l'ANF, l'ANF (100 μ M) fut appliqué à nouveau pendant 1 seconde afin d'évaluer la sensibilité du courant stimulé à l'ANF. **B.** Exemple de tracés de courant relatif semblable à ce qui est présenté en A à l'exception qu'une rampe de potentiel de 250 ms allant de -50 à +60 mV fut imposée 4.5 secondes suivant le début du protocole tel qu'illustré sous la trace. Deux secondes suivant le début de la dépolarisation, les cellules furent exposées à 100 μ M ANF pendant 2 secondes tel qu'illustré au-dessus de la trace. Les protocoles de voltage imposé et d'exposition à l'ANF furent élaborés afin d'imposer la rampe de potentiel au courant stimulé par le retrait de l'ANF. *Encart* Amplitude relative du courant en fonction du potentiel membranaire imposé par un protocole de rampe (le potentiel d'inversion de cette cellule était de -16 mV). Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions D et IV à 23 °C.

Modélisation mathématique des interactions de l'ANF avec $I_{Cl(Ca)}$

Afin de mieux comprendre l'interaction entre l'ANF et le canal, nous avons entrepris le développement d'un modèle cinétique pouvant reproduire nos résultats expérimentaux. Les effets de l'ANF ont été simulés mathématiquement en utilisant une méthode de modélisation informatique semblable à celle précédemment rapportée par notre groupe (Remillard & Leblanc, 1996). Les simulations informatiques furent réalisées afin d'approximer nos résultats expérimentaux. La figure 3.B.8 présente les différents modèles cinétiques qui furent évalués. Puisque les myocytes étaient dialysés avec une $[Ca^{2+}]_i$ fixée à 500 nM, nous avons simplifié notre analyse théorique en nous concentrant sur les étapes où l'ANF interagit avec le canal bien que nous reconnaissons qu'un modèle plus élaboré du canal (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000) impliquant la dépendance du canal à la $[Ca^{2+}]_i$ devra être testé dans le futur. Pour tous les modèles testés, l'ouverture des Cl_{Ca} est modélisée par une transition unique dépendante du voltage de l'état fermé (C) à l'état ouvert (O_1). Bien qu'un modèle de liaison simple avec un site de liaison unique menant à l'inhibition et à la stimulation (figure 3.B.10-A) puisse reproduire de façon satisfaisante l'inhibition et la stimulation transitoire de $I_{Cl(Ca)}$ à 10 μ M ANF, il ne peut reproduire la stimulation biphasique de $I_{Cl(Ca)}$ observée avec 100 μ M et 1 mM ANF. Par conséquent, les modèles alternatifs reposent plutôt sur l'existence d'un site inhibiteur et d'un (figure 3.B.10-B et C) ou deux (figure 3.B.10-D, E et F) sites de liaison avec une action stimulante. Pour tous les modèles montrés à la figure 3.B.10-B jusqu'à F, l'application d'ANF interagit d'abord avec un site de liaison menant à l'inhibition du courant (B_1). L'état B_1 masque la stimulation jusqu'à ce que la drogue

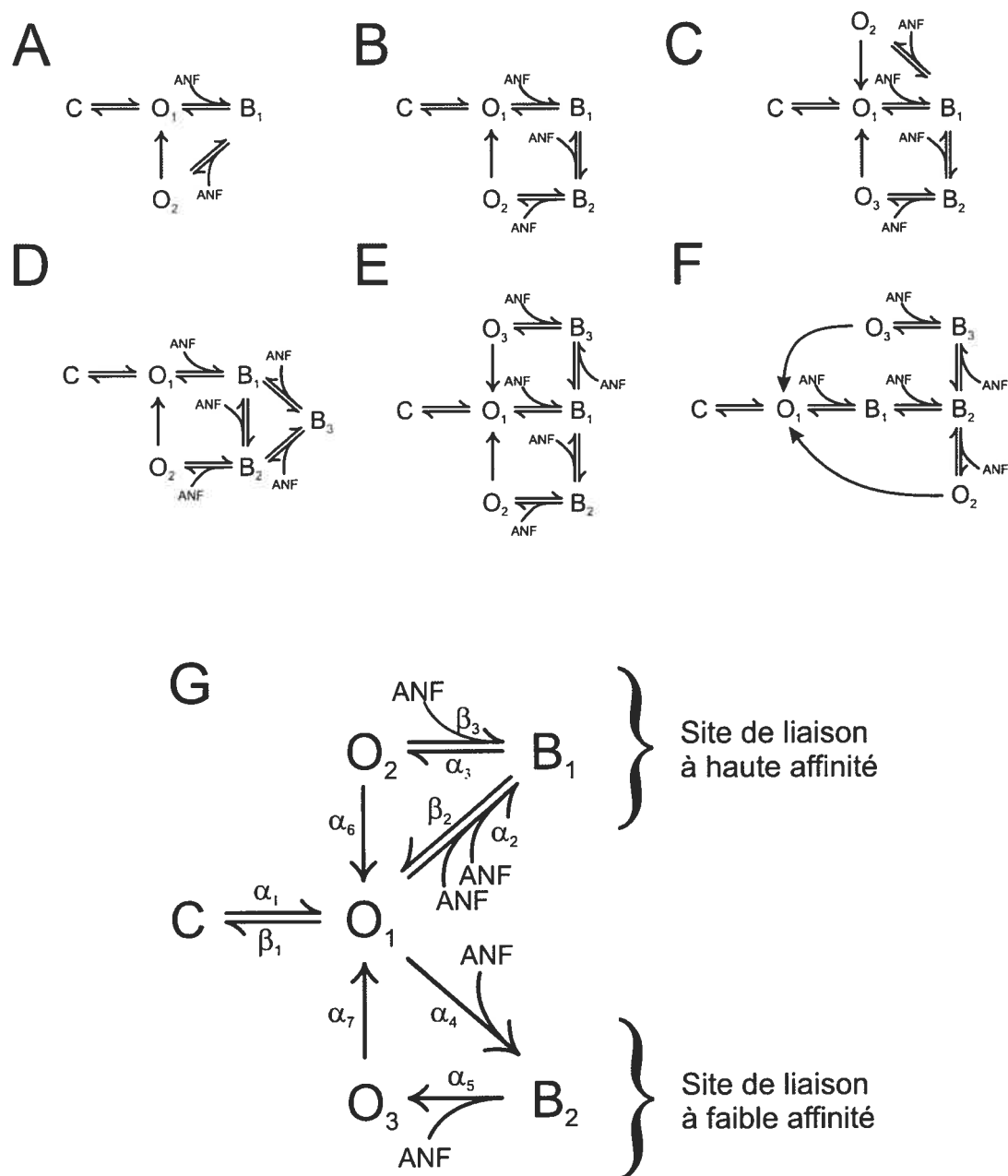


Figure 3.B.10 Différents modèles cinétiques évalués par simulation informatique

C, O_n et B_n représentent les états cinétiques fermés, ouverts et inhibés. ANF, acide niflumique. Panneau G, α_n et β_n sont les constantes décrivant les transitions entre les états individuels. Les équations décrivant toutes les constantes sont présentées dans le tableau en appendice II.

soit rapidement lavée. Nous avons testé plusieurs variantes de modèles comportant un état de haute affinité commun pour l'inhibition et la stimulation et un état de faible affinité stimulant (figure 3.B.10-C) et différents modèles avec un site inhibiteur unique et deux sites de liaison stimulant avec différentes affinités pour l'ANF (figure 3.B.10-D, E et F). Bien que ces modèles cinétiques puissent rendre compte de certains aspects de la stimulation induite par l'ANF, aucun ne peut convenablement bien reproduire à la fois la dépendance à la concentration et au temps de l'inhibition et de l'augmentation du courant par cette substance. En fait, aucun des modèles présentés précédemment ne permet de reproduire qualitativement les résultats expérimentaux.

Par contre, la figure 3.B.10-G présente un modèle qui reproduit nos données expérimentales. Les équations décrivant les constantes et autres paramètres utilisés dans la simulation sont présentées au tableau de l'*Appendice II*. α_n et β_n sont les constantes de taux pour les cinétiques de transition montrées. Les variables de « gating » (expriment la probabilité d'ouverture du canal à un état cinétique donné) des états stimulés O_2 et O_3 , qui sont des états équivalents, ont été fixées à 1. L'état ouvert et non-stimulé (O_1) a arbitrairement été fixé à 0.7. L'activation et la désactivation ont été modélisées par des transitions dépendantes du potentiel et décrites par des relations Boltzmann. Le modèle assume par ailleurs l'existence de sites à haute (entre 10 et 23 μM) et faible (1.25 mM) affinités tel qu'indiqué à la figure 3.B.10-G. La liaison de l'ANF a été modélisée en utilisant l'équation de Hill avec un coefficient de Hill de 1 ($O_1 \rightarrow B_2$, $O_2 \rightarrow B_1$) ou de 2 ($O_1 \rightarrow B_1$). Le taux de dissociation de l'ANF de tous les états liés et le taux de récupération des états

stimulés à non-stimulés ont tous été posés comme étant indépendants de la concentration en ANF.

Les figures 3.B.11-A et B montrent des tracés de courants stimulés dérivés du modèle en réponse à une exposition de 2 secondes (figure 3.B.11-A) ou 6 secondes (figure 3.B.11-B) du composé aux concentrations utilisées dans nos expériences tel qu'indiqué sous les tracés de courants normalisés. Le protocole de voltage imposé montré au bas de la figure était identique à celui utilisé dans nos expériences décrites à la figure 3.B.3. Les stimulations ont toutes débuté sous des conditions non stationnaires expliquant pourquoi la variable de « gating » de l'état fermé était supérieure à 0 (valeur arbitraire de 0.6). Ceci a permis à la stimulation de commencer avec des canaux déjà ouverts au potentiel de maintien (-50 mV) pour des myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ ou plus, tel que précédemment rapporté (voir *Section 3.A*). Conséquemment, le saut dépolarisant à $+60$ mV induit un courant instantané suivi d'une composante dépendante du temps de $I_{Cl(Ca)}$ (figures 3.B.1, 3.B.2, 3.B.3, 3.B.7 et 3.B.9) qui suit une relation exponentielle simple avec une constante de temps de 220 ms, une valeur semblable à celle rapportée précédemment (voir *Section 3.A*). L'application d'ANF cause une inhibition rapide en fonction de la concentration du courant qui est plus marquée que nos données actuelles. L'inhibition maximale estimée par une fonction logistique pour les données expérimentales et le modèle étaient semblables ($62 \pm 5\%$ et $64.5 \pm 0.9\%$, respectivement). Toutefois, le modèle résulte en une valeur d' IC_{50} qui est approximativement 4 fois inférieure (31 μ M) à celle évaluée à partir de nos données expérimentales actuelles (117 ± 10 μ M; figure 3.B.4). Toutes tentatives pour ajuster les paramètres du modèle présenté à l'*Annexe II*

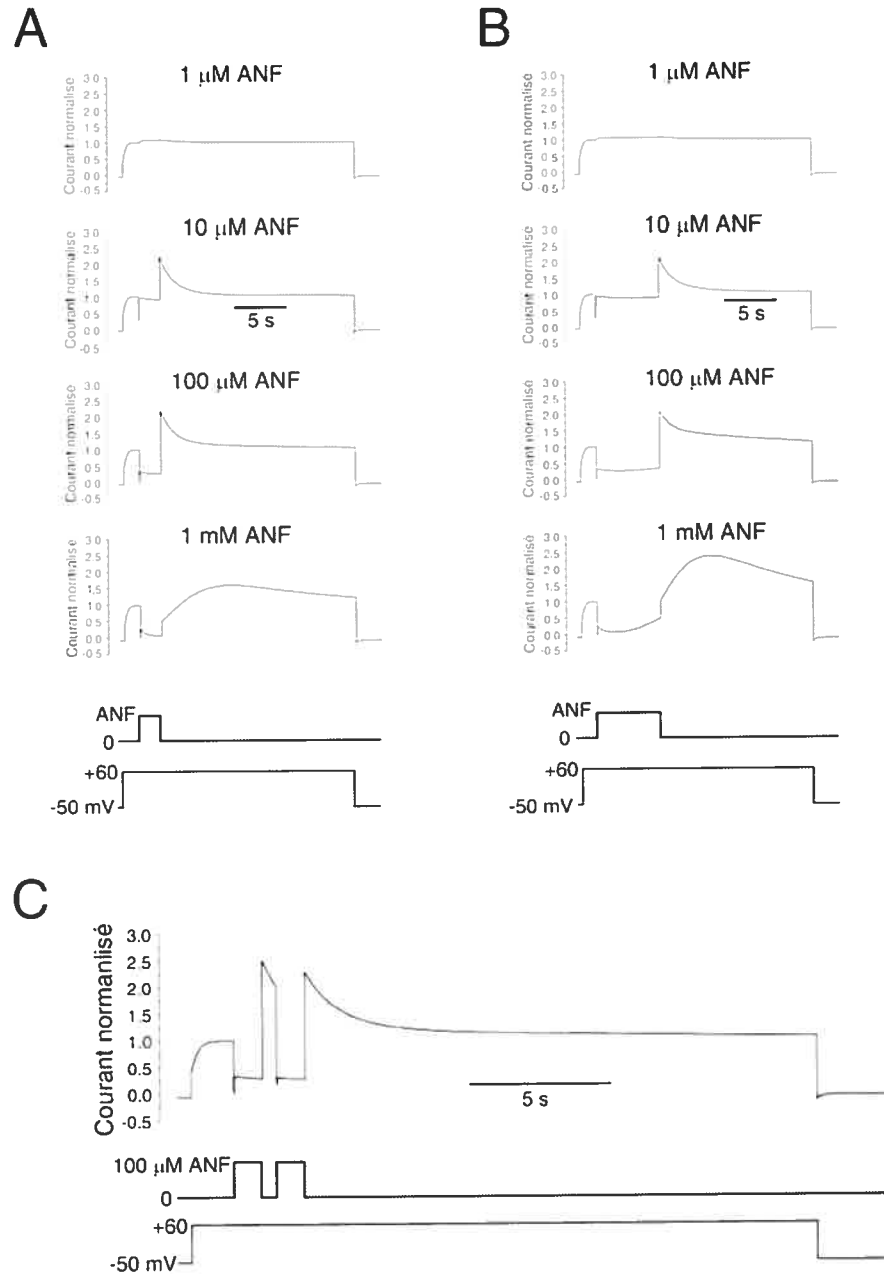


Figure 3.B.11 Simulation des effets de l'ANF sur $I_{Ca(Ca)}$ par modélisation informatique

A. Courants stimulés et normalisés induits par un saut de potentiel de 22 secondes à +60 mV (PM = -50 mV). Dans ces simulations, une exposition de 2 secondes à 1, 10, 100 μ M et 1 mM (traces de haut en bas) ANF fut imposée suite à une dépolarisation de 2 secondes à +60 mV tel qu'illustré par la trace immédiatement au-dessus du protocole de voltage imposé. **B.** Panneau identique à A à l'exception que chaque concentration de l'ANF fut appliquée pendant 6 secondes. **C.** Simulation démontrant l'effet d'une exposition double à 100 μ M ANF. Les deux expositions (trace du centre) de 1 seconde furent séparées par 500 ms. Le protocole de voltage imposé qui est illustré au bas est identique à celui décrit dans les panneaux A et B.

afin de reproduire la dépendance de l'action inhibitrice de l'ANF à la concentration ont eu pour conséquence de rendre le modèle incapable de reproduire les paramètres décrivant le décours temporel de la stimulation induite par l'ANF sur le courant, un aspect important de l'étude.

Alors que le lavage de 1 μM ANF induit un faible effet sur le courant modélisé, le lavage de cette drogue lorsque appliquée à des concentrations entre 10 μM et 1 mM mène à une stimulation transitoire conformément à nos données expérimentales. Les courants stimulés par le retrait de 10 ou 100 μM ANF étaient plus rapides que ceux induits par l'exposition à 1 mM d'ANF. Notons qu'une plus longue exposition à 100 μM ANF mène clairement à une relaxation biphasique du courant (figure 3.B.11-B, 3^e tracé à partir du haut) tel qu'observé dans nos expériences (figure 3.B.3-C). La nature biphasique du courant stimulé suivant le lavage de 1 mM ANF, caractérisée par une phase rapide suivie d'une phase très lente (figure 3.B.3-D), est également bien reproduite par le modèle (figure 3.B.3-B, 4^e tracé à partir du haut). Une récupération partielle du courant après le début rapide de l'inhibition fut fréquemment observée durant l'application de l'ANF entre 10 μM à 1 mM (figure 3.B.3-B, C et D). Le modèle reproduit qualitativement ce comportement avec 100 μM et 1 mM (figure 3.B.11-B, 2^e et 3^e tracés), ce qui suggère que le canal inhibé par l'ANF (B_1 et B_2) peut transiter partiellement par les états ouverts (O_2 et O_3). Finalement, le modèle simule adéquatement l'impact d'une exposition répétée à l'ANF (comparer la figure 3.B.11-C avec la figure 3.B.9-A) ce qui suggère que les courants témoins et stimulés sont produits par le même canal, mais sur des états cinétiques distincts.

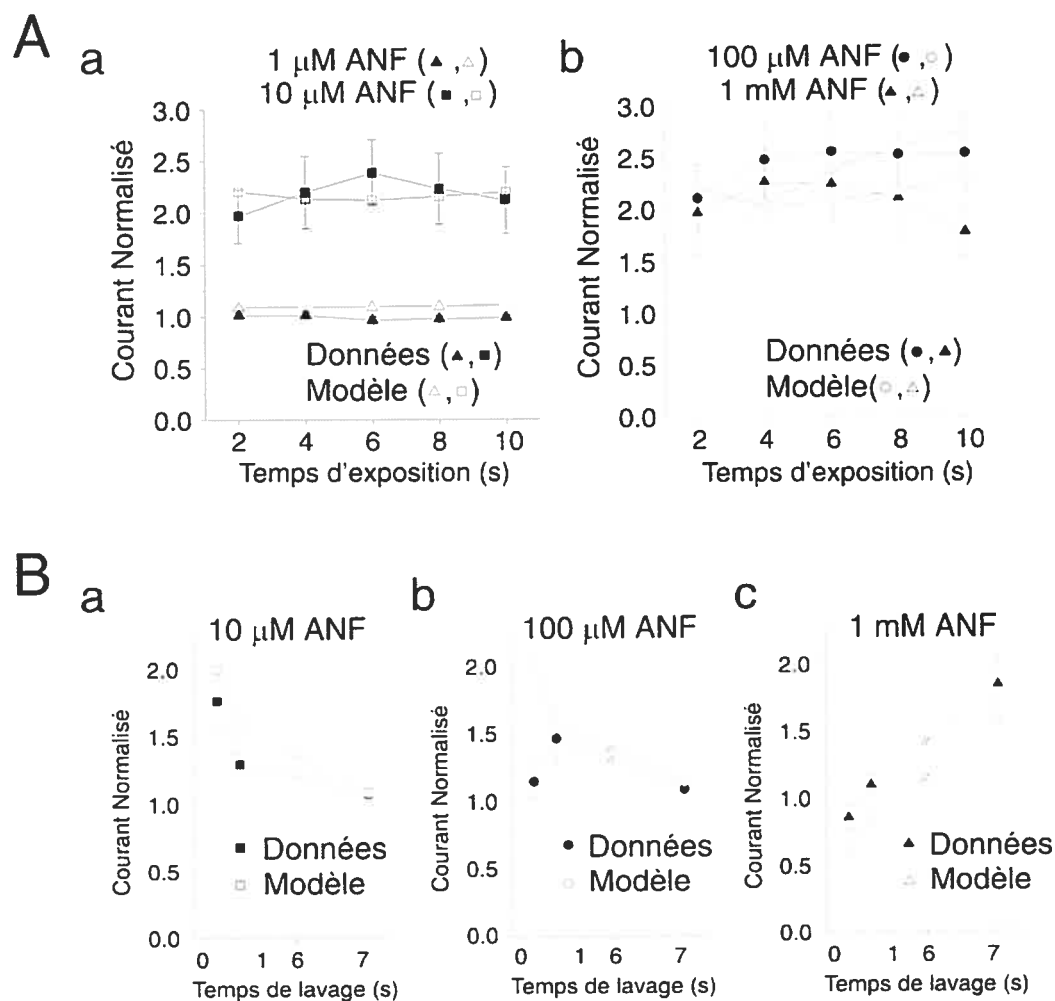


Figure 3.B.12 Comparaison entre les données expérimentales et le modèle à trois états ouverts de la figure 3.B.10-G

A. Représentation graphique des données expérimentales et du modèle pour la stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ induite par le retrait de l'ANF en fonction de la concentration du composé et du potentiel membranaire imposé. Les données expérimentales sont reproduites de la figure 3.B.4. Un saut de potentiel de 22 secondes à +60 mV fut appliqué ($PM = -50$ mV) et l'ANF fut appliqué pendant 2 à 10 secondes aux concentrations indiquées au-dessus de chaque graphique, 2 secondes suivant le début du saut de potentiel. Notons la bonne corrélation entre les données expérimentales (symboles pleins) et simulées (symboles vides). **B.** Graphique présentant le décours temporel de $I_{Cl(Ca)}$ stimulé par l'ANF tel qu'enregistré (symboles pleins) ou simulé (symboles vides) par le retrait de 10 μ M, 100 μ M ou 1 μ M (panneaux a, b et c, respectivement) ANF (exposition de 2 secondes). Les temps de lavages choisis correspondent aux temps pour atteindre l'amplitude maximale des expériences décrites à la figure 3.B.4. À l'exception du temps de lavage le plus court avec 100 μ M ANF où une divergence significative fut relevée, le modèle reproduit généralement bien les valeurs expérimentales.

La figure 3.B.12 illustre une comparaison quantitative des effets de l'ANF sur les courants enregistrés (symboles pleins) et stimulés (symboles vides). Le modèle décrit adéquatement l'augmentation importante du courant stimulé suivant le lavage d'ANF (de 1 à 100 μM). Toutefois, alors que les données expérimentales montrent une diminution du courant suivant une exposition à l'ANF supérieure à 6 secondes, le modèle présente une augmentation progressive du courant stimulé en fonction du temps d'exposition. Les résultats de simulations sont généralement à l'intérieur d'une déviation standard pour chaque mesure moyenne expérimentale. La modélisation de cette relation serrée peut seulement être réalisée en augmentant le coefficient de Hill à 2 dans l'équation décrivant la constante de taux α_2 (figure 3.B.10-G; tableau *Appendice II*) du site à haute affinité, ce qui suggère que deux molécules d'ANF ou plus peuvent être nécessaires pour la stimulation de $I_{\text{Cl(Ca)}}$. La figure 3.B.12-B présente des graphiques illustrant un comportement dépendant du temps du courant simulé en comparaison avec $I_{\text{Cl(Ca)}}$ mesuré. Les mesures furent réalisées à des temps de lavage qui provoquèrent un courant stimulé maximal pour chacune des trois concentrations d'ANF (expositions de 2 secondes). Ces graphiques présentent la concordance entre les données expérimentales et le modèle et ce, pour les trois concentrations d'ANF à l'exception de la différence mentionnée plus tôt au temps de lavage avec 100 μM .

Section 3.C - Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII

La dialyse de myocytes d'artères pulmonaires avec une solution interne contenant 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ induit un courant Cl^- avec des cinétiques d'activation et de désactivation tel qu'exposé précédemment. Nous avons cependant observé une baisse progressive de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ immédiatement suite à l'obtention de l'accès au milieu intracellulaire jusqu'à l'obtention d'un plateau après environ deux minutes (figure 3.C.1-Aa et b, traces noires). La présence d'ATP dans la solution interne pourrait causer une diminution des courants macroscopiques si la phosphorylation par l'ATP inhibe $I_{Cl(Ca)}$. Afin de vérifier cette hypothèse, l'ATP contenu dans la solution de pipette fut remplacé par une forme non-hydrolysable, soit l'AMP-PNP, à la même concentration (3 mM). La dialyse d'une solution interne contenant l'AMP-PNP n'empêcha pas complètement la diminution du courant après la rupture de la membrane de « patch » sous la pipette, mais en réduisit considérablement l'amplitude (figure 3.C.1-Aa et Ab, traces vertes). Après deux minutes de dialyse, tant la composante instantanée que soutenue des courants induits par une solution de pipette contenant l'AMP-PNP étaient significativement plus grandes que ceux induits en présence d'ATP (figure 3.C.1-B). Ceci suggère donc que la dialyse d'ATP, plus lente que celle du Ca^{2+} , provoque l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ via l'activation d'enzymes et de processus de phosphotransferts.

Phosphorylation par CaMKII et $I_{Cl(Ca)}$ activé par l'influx calcique

Wang & Kotlikoff (1997) ont récemment rapporté l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par la protéine kinase dépendante de la calmoduline (CaMKII) dans le muscle lisse de la

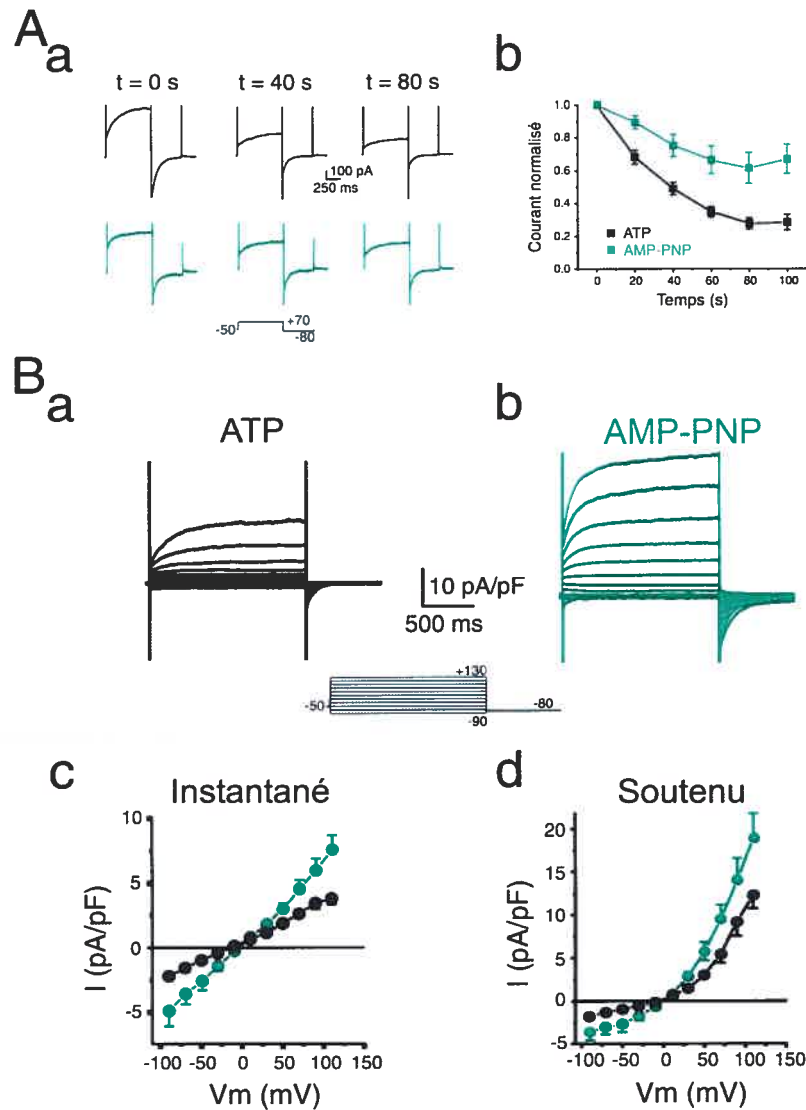


Figure 3.C.1 Effets du remplacement de l'ATP par son analogue non-hydrolysable, l'AMP-PNP sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes pulmonaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A. Diminution progressive de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ (« run-down ») induit en présence de 250 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (n=13-22). L'axe horizontal est le temps suivant la rupture de la membrane sous la pipette. **Panneau a.** Exemple de tracés de $I_{Cl(Ca)}$ induit par une dépolarisation à +70 mV (PM = -50 mV) suivie par une hyperpolarisation à -80 mV de myocytes pulmonaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ et 3 mM ATP (noir, haut) ou 3 mM AMP-PNP (vert, bas) enregistrés immédiatement suivant la rupture de la membrane sous la pipette. **Panneau b.** Décours temporel des changements moyens d'amplitude de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à +70 mV (PM = -50 mV) de cellules dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ et 3 mM ATP (noir, n=6) ou 3 mM AMP-PNP (vert, n=9) d'expériences semblables à celle illustrée en a. **B.** **Panneaux a et b.** Famille de courants représentatifs induits avec une solution de pipette contenant 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ et 3 mM ATP (a, noir) ou AMP-PNP (b, vert). À partir d'un PM de -50 mV, des sauts de potentiels (750 ms) de -90 mV à +110 furent appliqués avec un incrément de 20 mV. Chaque saut était suivi d'une repolarisation à -80 mV pour 500 ms. **Panneaux c et d.** Courbe IV moyenne de la composante instantanée (c) et soutenue (d) de $I_{Cl(Ca)}$ induit en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ avec une solution interne contenant de l'ATP (noir, n=9) ou AMP-PNP (vert, n=12) d'expériences tel que présenté en Ba et Bb.

trachée de cheval (Wang & Kotlikoff, 1997a). Par conséquent, étant donné l'importance physiologique de cette enzyme et sur la base des résultats précédents concernant l'action de l'ATP, nous avons entrepris d'évaluer l'implication potentielle de CaMKII dans la modulation de $I_{Cl(Ca)}$ de cellules musculaires lisses vasculaires de lapin par la phosphorylation. Pour ce faire, $I_{Cl(Ca)}$ fut tout d'abord enregistré dans des cellules musculaires lisses de la veine porte et de l'artère pulmonaire à l'aide de la technique de « patch » perforé où un influx calcique est généré via les canaux $Ca_{(L)}$. À partir d'un potentiel membranaire maintenu à -70 mV, la cellule fut dépolarisée à $+10$ mV afin de provoquer un courant entrant calcique rapide et sensible à la nifédipine. La repolarisation à -70 mV provoqua un courant de queue entrant lent et de grande amplitude qui est généré par $I_{Cl(Ca)}$ (figure 3.C.2-A). L'exposition du myocyte de la veine porte au KN-93 ($5 \mu M$), un inhibiteur spécifique de CaMKII, résulta en une diminution de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$, mais également du courant $Ca_{(L)}$ (figure 3.C.2-A). Par conséquent, la réduction de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ pourrait simplement être attribuable à la diminution d'ions Ca^{2+} entrant par les canaux $Ca_{(L)}$. Dans l'exemple illustré à la figure 3.C.2, alors que le courant calcique fut diminué de 45% par le KN-93, $I_{Cl(Ca)}$ fut réduit de 68%. Sur un total de cinq expériences, le KN-93 amena une réduction à la fois du courant $Ca_{(L)}$ ($38 \pm 6\%$) et $I_{Cl(Ca)}$ ($51 \pm 10\%$). Par contre, suite au retrait du KN-93 du milieu extracellulaire, une certaine proportion de $I_{Cl(Ca)}$ fut récupérée alors que le courant calcique a continué de diminuer tel que démontré par le graphique exprimant le décours temporel des courants $Ca_{(L)}$ et $I_{Cl(Ca)}$ lors de l'exposition au KN-93 (figure 3.C.2-A). La même méthode fut utilisée pour l'artère pulmonaire à l'exception que le myocyte fut maintenu à -50 mV et dépolarisé

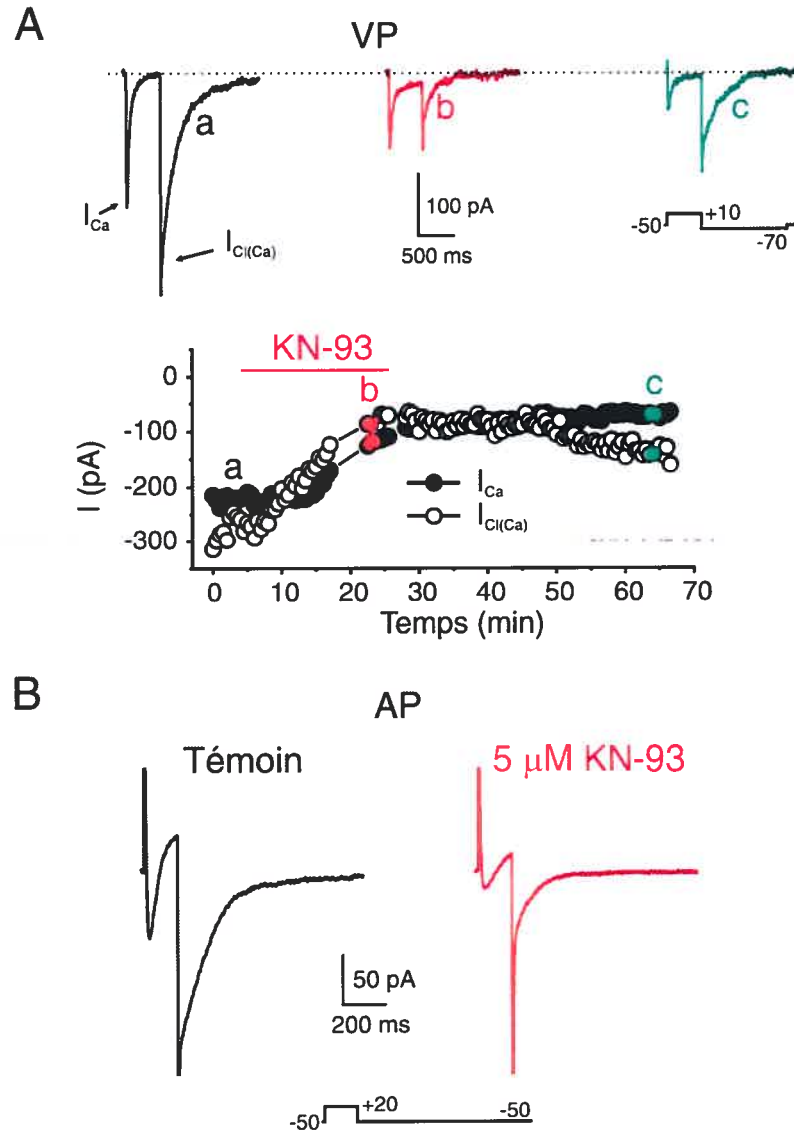


Figure 3.C.2 Effets d'un inhibiteur de CaMKII, le KN-93, sur les courants induits par une dépolarisation enregistrés en configuration de patch perforé

A. Exemple d'expérience réalisée avec des cellules musculaires lisses de la veine porte illustrant l'effet de 5 μM KN-93 sur I_{Cl(Ca)} induit par l'influx calcique via l'activation des canaux Ca_(L). Les courants furent enregistrés en utilisant la méthode de patch perforé avec la nystatine (300 μg/ml). Le Bay K 8644 (1 μM) fut inclus dans la solution externe afin d'augmenter le courant Ca_(L). Les trois traces du haut représentent les courants enregistrés avant (a, noir), pendant (b, rouge) et suivant (c, vert) l'application de 5 μM KN-93. Les courants furent induits par une dépolarisation à +10 mV de 500 ms et d'une repolarisation à -70 mV pendant 1.25 seconde toutes les 30 secondes (PM = -70 mV). Le graphique du bas exprime l'amplitude du courant entrant Ca_(L) maximal à +10 mV (cercles pleins) et le lent courant de queue I_{Cl(Ca)} à -70 mV (cercles vides) en fonction du temps pour cette expérience; les mesures des trois tracés au-dessus sont identifiées. **B.** Courants représentatifs de myocytes d'artères pulmonaires en dépolarisant (PM = -50 mV) à +20 mV pour 200 ms en conditions témoins et suivant l'application de 5 μM KN-93 pendant 5 minutes (méthode du patch perforé avec amphotéricine B, 300 μg/ml). Notons que le KN-93 inhibe à la fois le courant Ca_(L) et I_{Cl(Ca)} dans les deux préparations. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions A et I à 23 °C.

à +20 mV et des résultats semblables furent obtenus. Les courants calciques et $I_{Cl(Ca)}$ furent réduits de $69 \pm 9\%$ et $54 \pm 2\%$, respectivement ($n=5$). Par contre, dû à l'effet du KN-93 sur le courant calcique, il est difficile d'évaluer l'importance réelle d'une phosphorylation par CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$, impliquant qu'une technique alternative a dû être utilisée.

Effet du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence d'une $[Ca^{2+}]_i$ libre fixe et connue dans la veine porte

L'exposition de cellules musculaires lisses de la veine porte dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ à 5 μ M KN-93 pour une durée minimale de 10 minutes n'a augmenté ni la composante instantanée ni soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ dans dix myocytes testés. L'amplitude moyenne des composantes instantanées et soutenues de ces expériences à +70 mV était de 1.6 ± 0.2 et 3.7 ± 0.6 pA/pF, respectivement, en conditions témoins et de 1.4 ± 0.2 et 3.1 ± 0.5 pA/pF, respectivement, en présence de KN-93. De plus, le KN-93 n'a pas affecté de façon significative les cinétiques d'activation ou de désactivation. Une constante $\tau_{d\acute{e}act}$ moyenne à -80 mV de 105 ± 10 et 87 ± 9 ms en absence et en présence de KN-93, respectivement, fut enregistrée dans dix myocytes. Par contre, pour sept des dix expériences où le KN-93 fut appliqué, le KN-93 a inhibé le courant macroscopique tel qu'illustré par l'exemple à la figure 3.C.3-A. Également, dans quatre des cinq myocytes veineux dialysés avec 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$, une réduction de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ fut enregistrée suite à une exposition au KN-93 (5 μ M), la cellule restante n'ayant aucunement réagi au composé. Précédant l'exposition à 5 μ M KN-93, le courant soutenu moyen était de 6.9 ± 0.6 pA/pF et de 4.8 ± 0.9

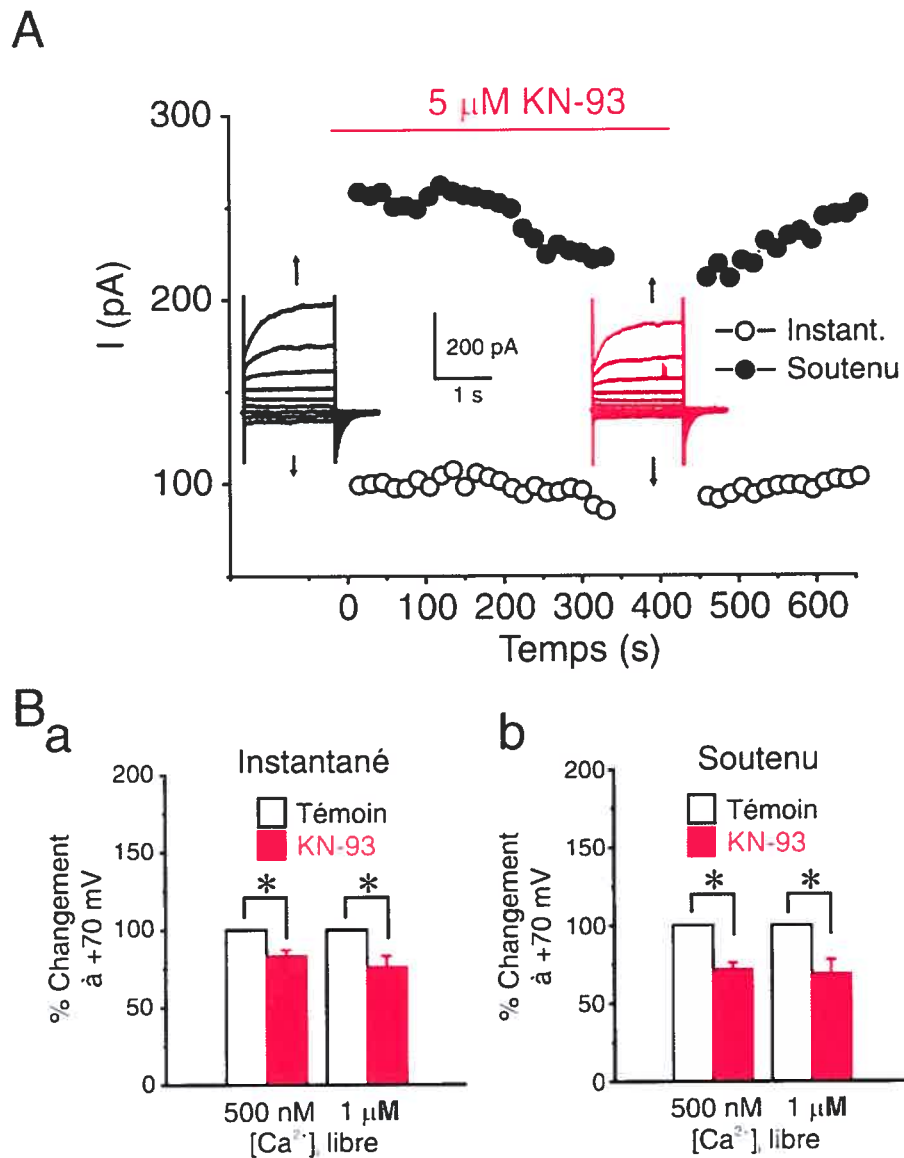


Figure 3.C.3 Inhibition réversible par le KN-93 de $I_{Cl(Ca)}$ induit par 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes de VP

A. Décours temporel de l'effet de 5 μ M KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ induit en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Le courant instantané (cercles vides) et soutenu (cercles pleins) suivant la dépolarisation de 1 seconde à +70 mV (PM = -50 mV). Le KN-93 fut appliqué pour la période indiquée par le trait horizontal. **Encarts** Deux familles de tracés représentatifs de $I_{Cl(Ca)}$ enregistrés avant (noir) ou suivant l'établissement d'une inhibition stable par le KN-93 (rouge). Ces courants furent induit par des sauts de 1.5 s de -90 à +130 mV appliqués à raison de 20 mV à partir du potentiel membranaire de -50 mV. **B.** Histogrammes rapportant le pourcentage moyen de changement à une concentration de 5 μ M KN-93 (colonnes rouges) relativement au contrôle (100%; colonnes blanches) pour le courant instantané (gauche) et soutenu (droite) enregistrés à +70 mV de myocytes de VP dialysés avec 500 nM ($n=7$) ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ libre ($n=5$) tel qu'indiqué. En a et b, * indiquent une différence significative relative au témoin avec $P < 0.05$. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

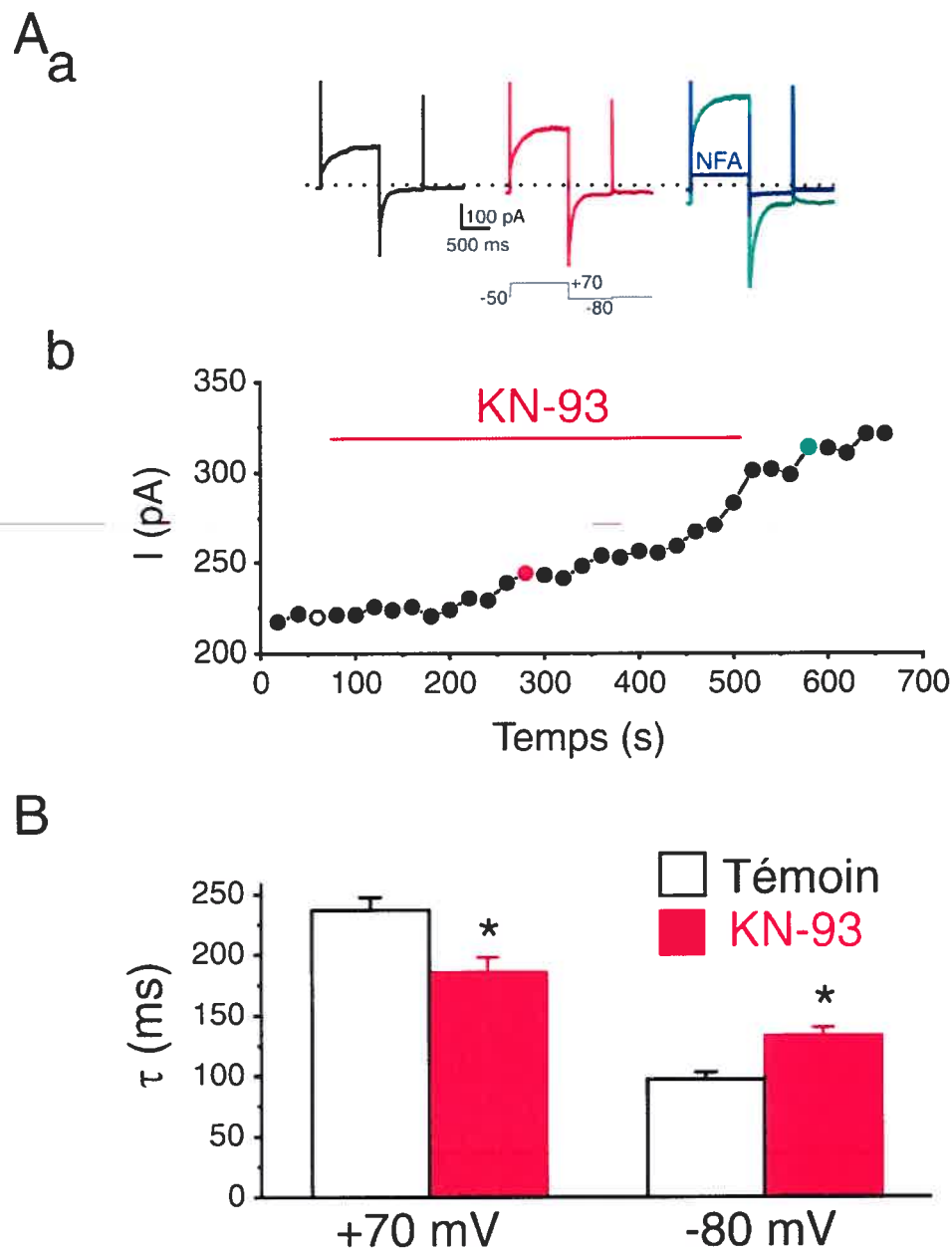


Figure 3.C.4 Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A. Panneau a. Tracés représentatifs de courants d'artères pulmonaires dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre qui furent enregistrés avant (noir), pendant (rouge) et suivant (vert) l'application de 5 μ M KN-93. Les courants furent induits par des sauts à +70 mV de 1 s suivi d'une hyperpolarisation de 750 ms à -80 mV (PM= -50 mV). Le courant en bleu est le courant enregistré suite à l'exposition à 100 μ M NFA. Panneau b. Graphique illustrant l'amplitude du courant soutenu en fonction du temps pour cette expérience; les mesures des trois tracés de courants au-dessus sont identifiées. **B.** L'histogramme rapporte la constante de temps (τ) moyenne de l'activation à +70 mV et de déactivation à -80 mV mesurée en absence (témoin) et présence de KN-93 (n=17) d'expériences semblables à ce qui est présenté en A. * Significativement différent du témoin avec $P < 0.01$. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

pA/pF après quatre minutes d'exposition au KN-93 (n=5). Le pourcentage de changement moyen suivant l'exposition à 5 μ M KN-93 pour les composantes instantanée et soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ est représenté dans le graphique à la figure 3.C.3-B. D'autre part, l'inclusion d'un peptide inhibiteur de treize acides aminés, l'ARIP (Autocamtide-2 Related Inhibitory Peptide; 1 μ M), hautement sélectif pour CaMKII (K_i de 40 nM) (Ishida *et al.*, 1995) dans la solution interne (500 nM $[Ca^{2+}]_i$), n'a produit aucun changement significatif de $I_{Cl(Ca)}$. Dans quatre expériences, le courant instantané moyen à +90 mV était de 2.4 ± 0.7 et de 3 ± 1 pA/pF en absence et en présence de 1 μ M ARIP, respectivement, alors que le courant soutenu était de 4 ± 1 et 7 ± 4 pA/pF en contrôle et avec ARIP, respectivement. Ces résultats, contrairement à ceux obtenus à l'aide du KN-93, suggèrent que $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes de la veine porte n'est pas soumis à une régulation par la CaMKII.

Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères pulmonaires et coronaires

Tel qu'illustré à la figure 3.C.4-A, l'exposition de myocytes d'AP à 5 μ M KN-93 a provoqué l'augmentation de $I_{Cl(Ca)}$ induit en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ dans 18 myocytes sur les 22 testés et n'a eu aucun effet sur les autres cellules. De ces 18 cellules, le KN-93 a augmenté le courant enregistré à -50 mV de -1.2 ± 0.1 à -2.4 ± 0.3 pA/pF et a augmenté la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à +70 mV de 4.9 ± 0.7 à 11 ± 1 pA/pF (figure 3.C.4-A). Toutefois, l'application de KN-93 pendant 10 minutes n'a eu aucun effet sur le courant induit en présence de 250 nM $[Ca^{2+}]_i$ dans six cellules d'AP. Cette augmentation de l'amplitude produite par le KN-93 s'est

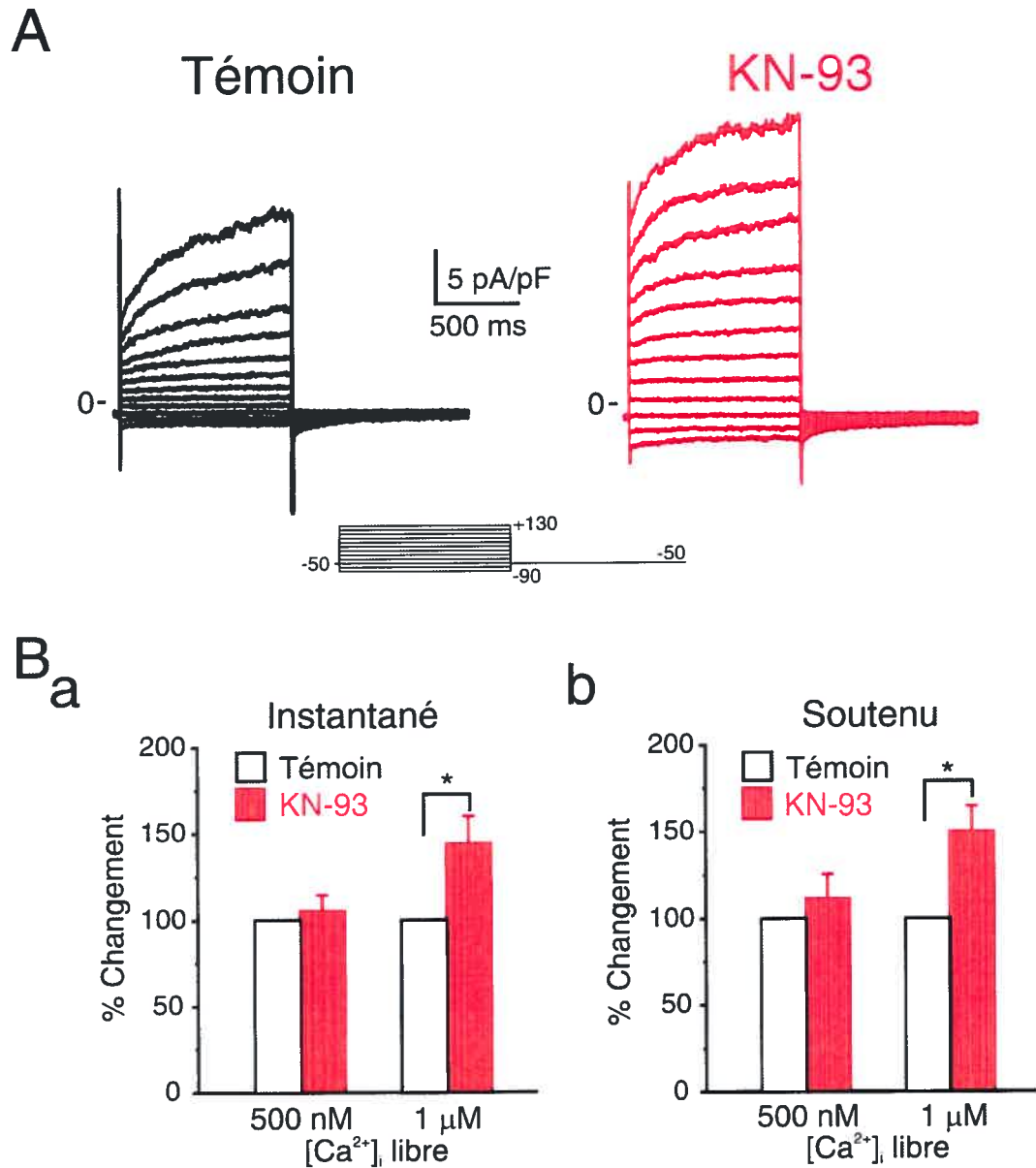


Figure 3.C.5 Effets du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AC dialysés avec 1 μ M [Ca²⁺]_i

A. Expérience représentative montrant l'effet de 5 μ M KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ enregistrés dans des cellules d'AC dialysées avec 1 μ M [Ca²⁺]_i. À partir d'un PM de -50 mV, les courants furent induits par des sauts de 1 seconde entre -90 et +130 mV appliqués avec des sauts de 20 mV. **B.** Histogramme rapportant le pourcentage de changement moyen relativement au contrôle (100%; colonnes blanches) du courant instantané (a) et soutenu (b) à +70 mV induit par 5 μ M KN-93 (colonnes rouges) de cellules d'AC dialysées avec 500 nM (n=11) ou 1 μ M [Ca²⁺]_i libre (n=14) tel qu'indiqué (solutions B et II : n=6 et n=10 pour 500 nM et 1 μ M [Ca²⁺]_i, respectivement; solutions C et II : n=5 et n=4 pour 500 nM et 1 μ M [Ca²⁺]_i, respectivement). En a et b, * indique une différence significative relative au contrôle avec $P < 0.05$ et $P < 0.01$, respectivement. Toutes les expériences furent enregistrées à 23 °C.

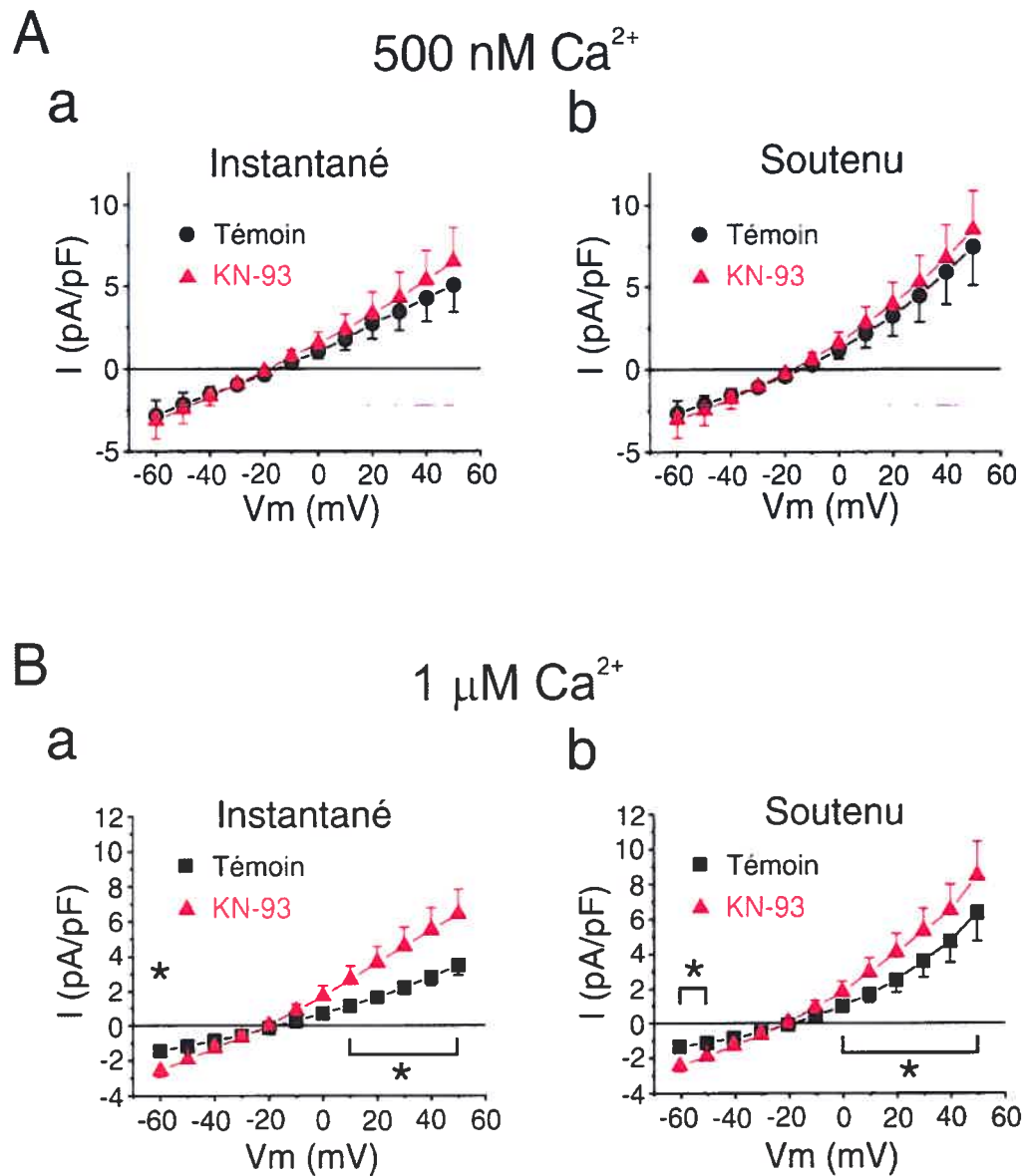


Figure 3.C.6 Effets du KN-93 sur $I_{C(Ca)}$ de myocytes d'AC à température quasi-physiologique

A. Courbes IV moyennes pour le courant instantané (a) et soutenu (b) enregistrés en conditions témoins (cercles noirs) et après au moins 5 minutes d'exposition à 10 μM KN-93 (triangles rouges; $n=8$) de myocytes d'AC dialysés avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **B.** Courbes IV moyennes pour le courant instantané (a) et soutenu (b) enregistrés en conditions témoins (carrés noirs) et après au moins 5 minutes d'exposition à 10 μM KN-93 (triangles rouges; $n=8$) de myocytes dialysés avec 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Différences significatives entre témoin et KN-93 pour le courant instantané (a) avec $P < 0.05$ furent détectées à -60 et à tous les voltages plus positifs que $+10$ mV, et pour le courant soutenu (b) à tous les voltages plus négatifs que -50 mV et plus positifs que 0 mV. Les courants étaient enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV.

avérée irréversible même cinq minutes après le lavage du KN-93 (figure 3.C.4-A) et est apparue associée à un changement des cinétiques du courant. En présence de KN-93, τ_{act} à +70 mV diminua de 237 ± 10 à 186 ± 11 ms et $\tau_{\text{déact}}$ à -80 mV augmenta de 98 ± 5 à 134 ± 6 ms ($n=16$). D'autre part, un analogue inactif du KN-93, le KN-92, n'a eu aucun effet tant sur l'amplitude de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ que sur ses cinétiques dans les artères pulmonaires et coronaires. Dans les myocytes d'AP, le courant soutenu moyen à +70 mV était de 11 ± 2 et 10 ± 2 pA/pF en absence et en présence de 5 μM de KN-92 ($n=7$). Le τ pour le courant entrant et sortant activé en fonction du temps en présence de KN-92 était de 235 ± 7 et 90 ± 10 ms, respectivement, ce qui n'est significativement pas différent du τ en conditions témoins (248 ± 5 et 99 ± 9 ms, respectivement).

Les courants $I_{\text{Cl(Ca)}}$ enregistrés dans les myocytes d'AP et d'AC présentant les mêmes caractéristiques (voir *section 3.A*), il fut ensuite entrepris d'évaluer si un effet du KN-93 semblable à celui observé dans l'AP était présent dans l'AC. En fait, l'application de 5 μM KN-93 a augmenté les composantes instantanée et soutenue de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ d'AC lorsque dialysées avec 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.C.5-A et B) mais pas avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.C.5-B). Les mêmes résultats ont été obtenus par l'exposition à 10 μM KN-93 de myocytes d'AC dialysés avec 500 nM et 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre à une température quasi-physiologique (30 °C) (figure 3.C.6). Par conséquent, l'application de KN-93 dans le milieu extracellulaire augmenta $I_{\text{Cl(Ca)}}$ des cellules musculaires lisses artérielles mais son effet dépend de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

L'impact du KN-93 sur les cinétiques de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ suggère que le composé influence le « gating » des Cl_{Ca} . La figure 3.C.7 démontre l'effet du KN-93 sur la

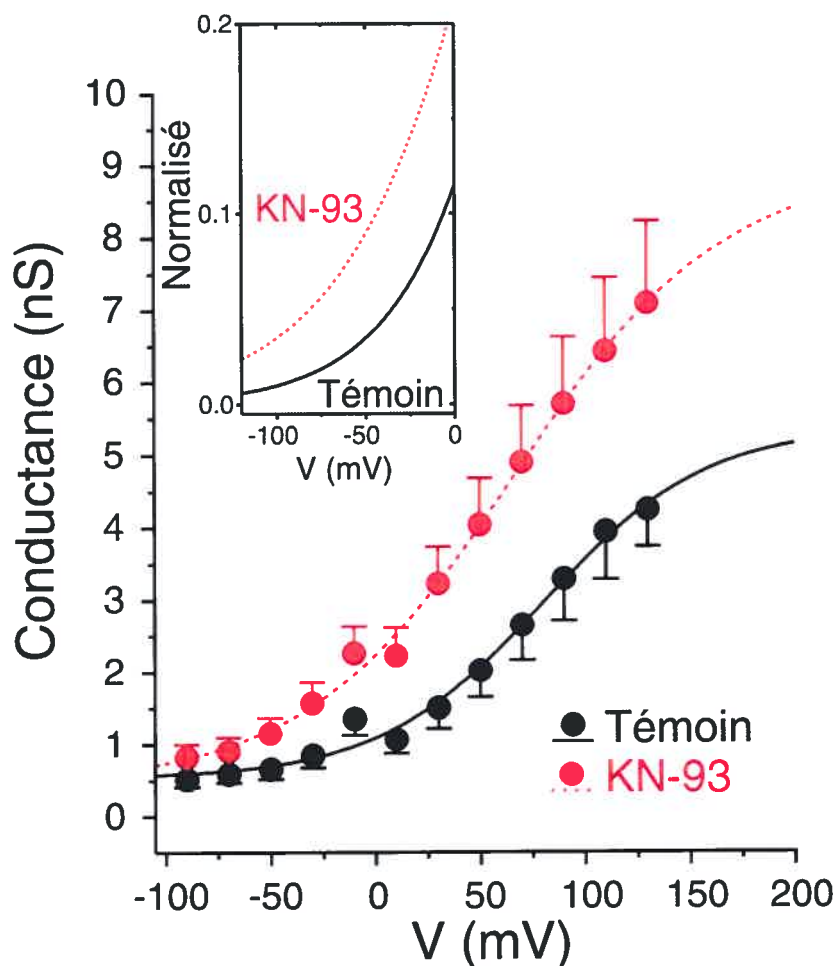


Figure 3.C.7 Effets du KN-93 sur la courbe d'activation en régime établi de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP

Graphique représentant la conductance (calculée selon $I/(V-E_{rev})$) du courant soutenu en fonction du potentiel membranaire de courants d'AP enregistrés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (cercles noirs et ligne pleine) et en présence de 5 μ M KN-93 (cercles rouges et ligne pointillée). Chaque point est la moyenne \pm s.e.m. de 9 cellules. Les lignes continues et pointillées suivent une relation sigmoïdale de type Boltzmann du moindre carré pour chaque point. Encart Conductance normalisée en absence (contrôle, ligne continue noire) et en présence de 5 μ M KN-93 (ligne pointillée rouge) pour les potentiels de -100 à 0 mV. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

dépendance au voltage de la conductance (G) de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères pulmonaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Ce paramètre fut calculé en utilisant l'équation suivante : $G = I/(V - E_{inv})$, où I est le courant soutenu, V le potentiel imposé et E_{inv} le potentiel d'inversion du courant. Le KN-93 a augmenté la conductance maximale de $I_{Cl(Ca)}$ en plus d'induire un déplacement vers la gauche de la courbe d'activation en régime établi. Le potentiel semi-maximal apparent ($V_{0.5}$) était de 96 ± 10 mV en contrôle et 66 ± 3 mV ($n=8$) en présence de 5 μ M KN-93. Nous n'avons toutefois pas observé de changement significatif du coefficient de la pente de la courbe. Le KN-93 a également produit un déplacement négatif similaire de $V_{0.5}$ dans sept myocytes d'AC dialysés avec 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ (111 ± 6 mV en contrôle et 73 ± 3 mV en KN-93, $P < 0.05$) avec une légère augmentation de la conductance maximale.

Effets de la dialyse d'un peptide inhibiteur de CaMKII dans les myocytes d'artères pulmonaires

Afin de s'assurer de la spécificité de l'effet observé du KN-93 sur $I_{Cl(Ca)}$ par son action sur CaMKII, la dialyse d'un peptide inhibiteur hautement spécifique pour l'enzyme fut réalisé. Les expériences furent réalisées en comparant $I_{Cl(Ca)}$ évoqué en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre avec ou sans l'inclusion d'ARIP (1 μ M) dans la solution interne. L'inclusion d'ARIP dans la pipette amena une augmentation rapide et marquée de l'amplitude du courant qui fut encore plus prononcée à des potentiels négatifs. Le courant instantané enregistré deux minutes suivant le bris de la cellule en présence d'ARIP dans la pipette était de -5.9 ± 0.8 et 6.7 ± 0.6 pA/pF à -90 et $+90$ mV, respectivement ($n=9$). Ces valeurs sont plus négatives que les courants

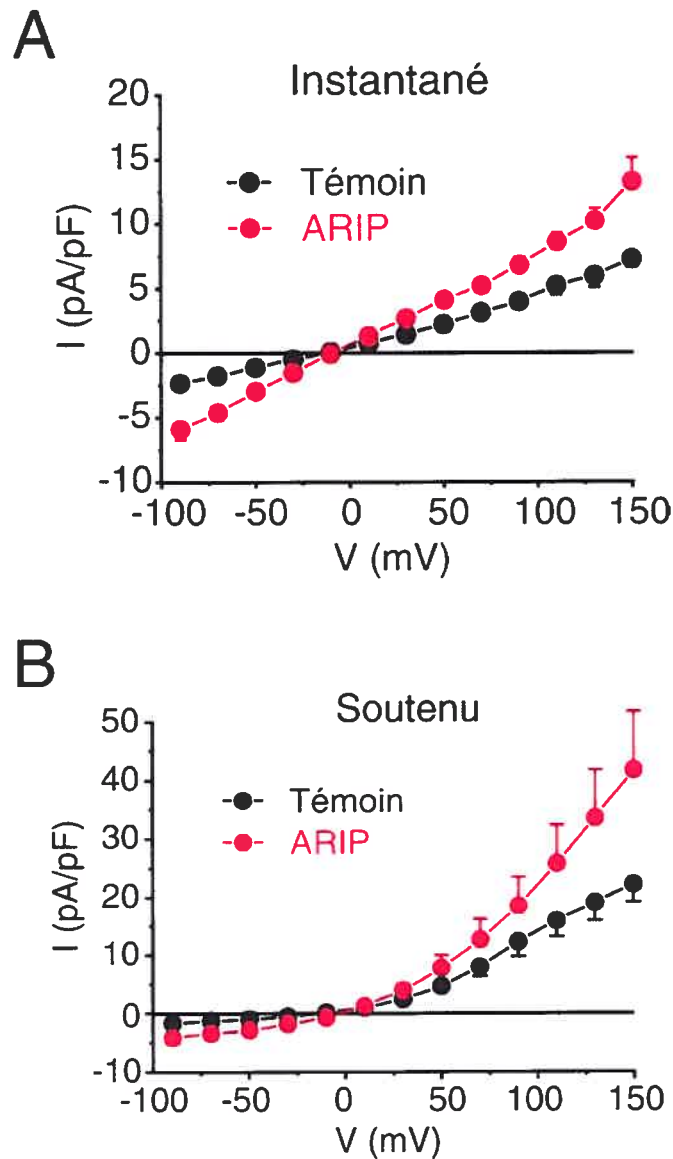


Figure 3.C.8 Effets d'un peptide inhibiteur de CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ d'AP dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A et B. Effets de la dialyse d'un inhibiteur peptidique sélectif pour CaMKII, « autocamide-2-related inhibitory peptide » (ARIP; 1 μ M) en fonction du potentiel membranaire du courant $I_{Cl(Ca)}$ instantané (A) et soutenu (B) enregistrés de myocytes d'AP dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (noir, n=9) ou en présence (rouge, n=7) d'ARIP. Les courants en conditions témoins et en présence de ARIP étaient significativement différents pour le courant instantané (A) avec $P < 0.01$ pour les potentiels supérieurs à +10 et inférieurs à -10 mV, et pour le courant soutenu (B) avec $P < 0.01$ pour les potentiels plus négatifs que -10 mV et $P \leq 0.05$ pour les potentiels entre +10 et +50 mV. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

enregistrés de cellules dialysées avec la solution interne contrôle avec -2.3 ± 0.4 et 3.9 ± 0.6 pA/pF à -90 et $+90$ mV, respectivement ($n=7$). La figure 3.C.8 montre la courbe *IV* moyenne de la composante instantanée (A) et soutenue (B) du courant induit par une solution de pipette contenant ARIP en comparaison avec la solution témoin. Par conséquent, la présence d'un inhibiteur peptidique spécifique à CaMKII dans le milieu intracellulaire augmenta $I_{Cl(Ca)}$ dans les cellules musculaires lisses d'AP.

Effets de CaMKII autothiophosphorylée sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'artères pulmonaires

Les expériences précédentes ont démontré que l'inhibition de CaMKII endogène des myocytes artériels par le KN-93 et un inhibiteur peptidique augmentait l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$. Par conséquent, la perfusion interne de cellules musculaires lisses d'artère pulmonaire avec la CaMKII constitutivement active devrait réduire l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$. La figure 3.C.9-A présente un exemple de tracés de courants induits avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ après trois minutes de dialyse en absence (figure 3.C.9-A, noir) et présence de CaMKII activée (figure 3.C.9-A, vert). Les composantes instantanée (figure 3.C.9-Ba) et soutenue (figure 3.C.9-Bb) de $I_{Cl(Ca)}$ furent toutes deux réduites de façon significative par la dialyse de l'enzyme constitutivement active. Le courant soutenu à -90 et $+90$ mV en présence de CaMKII activée était de -0.8 ± 0.1 et 5.7 ± 0.6 pA/pF ($n=7$) comparativement à -4 ± 1 et 12 ± 2 pA/pF en condition témoin ($n=7$). Les cinétiques du courant furent également modifiées par la présence de CaMKII active. La constante de temps du courant de queue à -50 mV suivant la dépolarisation à $+110$ mV était 124 ± 9 ($n=7$) et 83 ± 4 ms ($n=7$) en

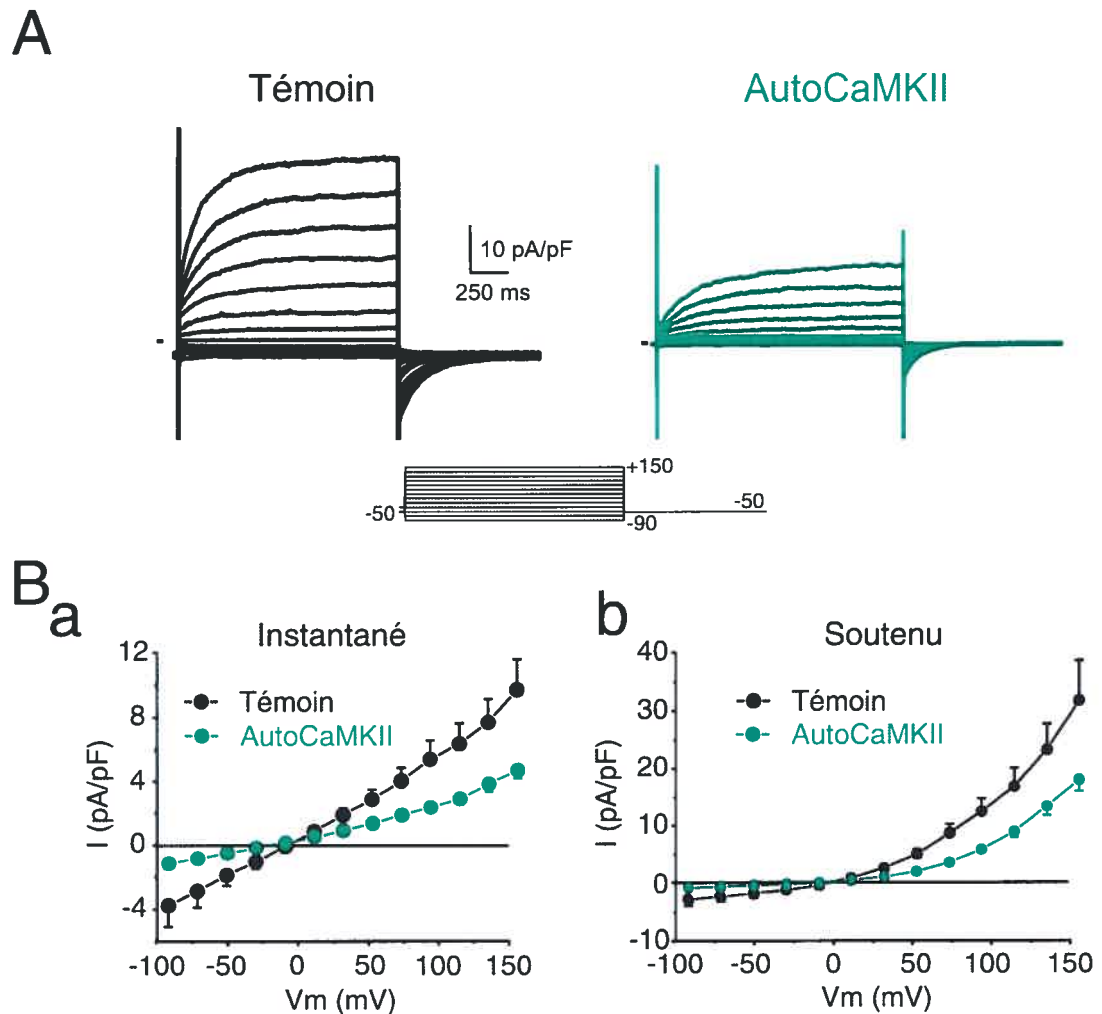


Figure 3.C.9 Effets de la dialyse de myocytes d'AP avec une forme constitutivement active de CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ d'AP en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$

A. Effets de la dialyse d'une forme constitutivement autophosphorylée et active de CaMKII sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP exposés à 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Le peptide fut dialysé dans la cellule à une concentration de 30 nM. Les courants en absence et en présence de l'enzyme active étaient enregistrés après trois minutes de dialyse de cellules différentes, mais isolées le même jour. Familles de tracés de courant $I_{Cl(Ca)}$ représentatifs en contrôle (noir) ou suivant la dialyse de la kinase (vert; +AutoCaMKII). Le protocole de voltage imposé consiste en sauts de 1.5 seconde entre -90 et +150 mV appliqués avec 20 mV d'intervalle à partir d'un PM = -50 mV. **Ba** et **b**, respectivement, représentent la relation IV pour les composantes instantanée et soutenue du courant $I_{Cl(Ca)}$ enregistrées en absence (cercles noirs, $n=7$) et en présence (cercles verts; $n=7$) de la kinase active. Les différences entre le contrôle et AutoCaMKII étaient significatives pour le courant instantané (**a**) avec $P < 0.01$ pour les potentiels plus positifs que +30 mV et plus négatifs que -10 mV, et pour le courant soutenu (**b**) avec $P < 0.01$ pour les potentiels plus positifs que +10 mV et avec $P < 0.05$ pour les potentiels plus négatifs que -10 mV. Toutes les expériences furent enregistrées en utilisant les solutions B et II à 23 °C.

absence et en présence de CaMKII autothiophosphorylée, respectivement. Par conséquent, la présence de CaMKII constitutivement active dans le cytoplasme peut modifier $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères pulmonaires de manière opposée à celle observée avec les inhibiteurs de CaMKII endogène.

Localisation intracellulaire d'enzymes activées par le Ca^{2+}

L'utilisation d'un anticorps spécifique contre CaMKII, mais sans discrimination entre les différentes isoformes a permis de démontrer la distribution homogène de l'enzyme dans le cytoplasme des cellules musculaires lisses d'artères coronaires au repos (figure 3.C.10-A et Db). Par contre, l'utilisation d'ionomycine (80 nM), un ionophore calcique, pour augmenter la $[Ca^{2+}]_i$ et l'exposition au ML-7, un inhibiteur de la MLCK, afin de limiter la contraction de la cellule musculaire lisse a permis d'observer la réponse spatiale de l'enzyme à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$. Plus précisément, nous avons observé qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à 500 nM induisait une translocation de l'enzyme vers le noyau et près de la membrane plasmique. Cette dernière observation est cohérente avec les résultats précédents, suggérant que CaMKII affecte l'activité du courant $I_{Cl(Ca)}$ de par sa localisation, suite à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. D'autre part, la régulation des canaux Cl_{Ca} par une kinase, en l'occurrence CaMKII, implique la participation d'au moins une phosphatase dans la régulation de Cl_{Ca} . La calcineurine, une phosphatase activée par le Ca^{2+} et la CaM est donc une candidate pour ce rôle et l'utilisation d'un anticorps contre la sous-unité CaNA a permis de démontrer la présence de cette enzyme dans

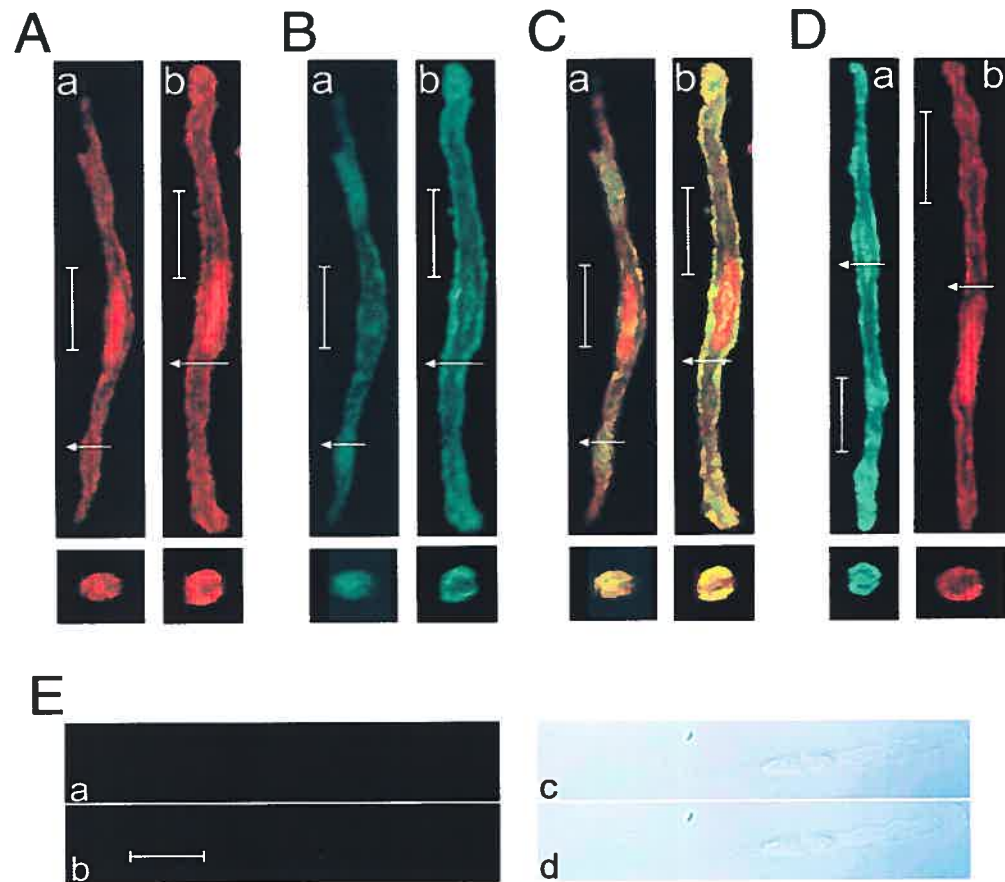


Figure 3.C.10 Immunodétection de CaMKII et CaN de myocytes coronaires

A. Immunomarquage de CaMKII dans les cellules musculaires lisses d'artères coronaires exposées soit à une solution externe normale pendant 15 minutes avant la fixation (a) ou après une préincubation en présence de 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]$ libre, 80 nM ionomycine et 3 μM ML-7 pendant 15 minutes afin d'élever la concentration intracellulaire en Ca^{2+} tout en limitant la contraction des myocytes (b). Les deux images rectangulaires du haut (1024 x 176 pixels) sont des coupes longitudinales de 0.4 μm d'épaisseur. Les deux images du bas sont des coupes transversales prises à l'endroit indiqué par la flèche blanche; ces images furent formées à partir de 28 sections longitudinales de 0.4 μm d'épaisseur. Ligne de calibration : 200 μm . **B.** Immunomarquage pour calcineurine (CaN) d'artères coronaires exposées aux mêmes conditions qu'en A. Notons que ces deux myocytes sont les mêmes que ceux présentés en A. Les deux images rectangulaires du haut (1024 x 176 pixels) sont des coupes longitudinales de 0.4 μm d'épaisseur. Ligne de calibration : 200 μm . Les deux images du bas sont des coupes transversales à l'endroit indiqué par la flèche blanche; ces images furent formées à partir de 28 sections longitudinales de 0.4 μm d'épaisseur. Notons le marquage plus intense des deux enzymes près de la membrane en condition de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ élevée (b) **C.** Images hybrides assemblées en utilisant celles illustrées en Aa et Ba (Ca) ainsi que Ab et Bb (Cb), respectivement. **D.** Simple marquage de CaN (a) et CaMKII (b), respectivement, de myocytes préincubés pendant 15 minutes en présence de 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]$, 80 nM ionomycine et 3 μM ML-7. Tous les paramètres, incluant la puissance des lasers et les paramètres d'acquisition, étaient semblables à ceux de A et B. **E.** Double marquage avec les anticorps secondaires fluorescents anti-souris (a) et anti-lapin (b) de myocytes exposés pendant 15 minutes à une solution externe. Les panneaux c et d sont, respectivement, les images de contraste de phase et composite. Tous les paramètres, incluant la puissance des lasers et les paramètres d'acquisition, étaient semblables à ceux utilisés pour les images de A à D.

les myocytes coronaires ainsi que sa distribution homogène dans le cytoplasme de la cellule au repos. Tout comme CaMKII, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ était accompagnée d'une translocation de l'enzyme dans le noyau mais également à la membrane (figure 3.C.10-B et Da). Il est également intéressant de noter le degré de colocalisation des deux enzymes à la membrane suite à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$, contrairement au myocyte en condition basale (figure 3.C.10-Ca et Cb).

Section 3.D - Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes artériels de lapin par la CaN*Effet d'une déphosphorylation par la calcineurine*

Les résultats présentés précédemment suggèrent qu'une phosphorylation de Cl_{Ca} ou d'une protéine régulatrice par CaMKII inhibe $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels. Il en découle qu'au moins une phosphatase soit impliquée dans la régulation de $I_{Cl(Ca)}$. L'étude d'immunofluorescence présentée à la section précédente suggère également que la calcineurine (CaN), une phosphatase activée par le Ca^{2+} , se déplace vers la membrane plasmique de myocytes coronaires en réponse à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. L'étude de l'action de la CaN sur l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes coronaires fut d'abord réalisée en étudiant l'effet de la cyclosporine A (CsA), un inhibiteur de la CaN, sur des courants $I_{Cl(Ca)}$ produits par 350, 500 nM ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ dans le cytoplasme. Puisque l' IC_{50} pour l'inhibition de la CaN par la CsA est de 10^{-9} – 10^{-8} M (Rusnak & Mertz, 2000), nous avons utilisé une concentration de CsA (10 μ M) qui devrait théoriquement abolir l'activité de CaN. L'application de CsA, soit dans le cytoplasme par sa dialyse via la solution de pipette ou encore l'application, dans la solution de perfusion, a inhibé $I_{Cl(Ca)}$ d'une façon qui varie avec la $[Ca^{2+}]_i$. Nous avons observé que la CsA appliquée de façon intracellulaire réduisit de façon significative $I_{Cl(Ca)}$ dans les myocytes dialysés avec 350 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (figure 3.D.1 et 3.D.2-A et Ca). Par exemple, avec 350 nM $[Ca^{2+}]_i$, la composante soutenue d' $I_{Cl(Ca)}$ enregistrée à +100 mV était de 14 ± 2 pA/pF (n=6) en absence et 5.6 ± 0.8 pA/pF (n=5) en présence de CsA dans le cytoplasme ($P < 0.001$). De même, $I_{Cl(Ca)}$ soutenu à +50 mV était respectivement 6.1 ± 0.8 pA/pF (n=23) et 3.6 ± 0.3

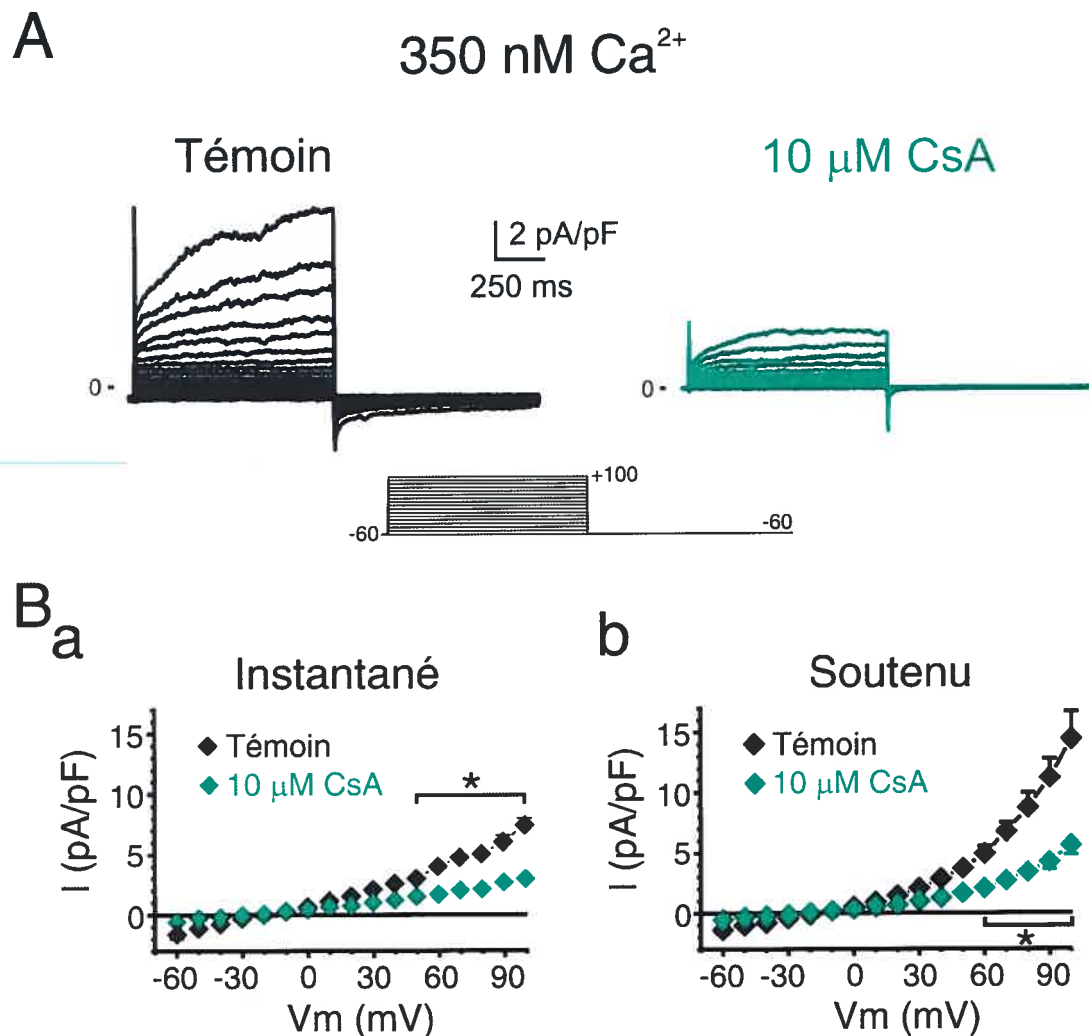


Figure 3.D.1 Effets de la cyclosporine A, un inhibiteur de CaN, sur $I_{\text{Cl(Ca)}}$ de myocytes coronaires dialysés avec $350 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$

A. Famille de tracés représentatifs de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ enregistrées de cellules musculaires lisses d'artères coronaires dialysées avec $350 \text{ nM } [\text{Ca}^{2+}]_i$ en absence (noir) ou en présence de Cyclosporin A ($10 \mu\text{M}$; CsA) (vert) dans la solution de pipette. À partir d'un PM = -60 mV , des sauts de potentiels (1 seconde) de -60 à $+100 \text{ mV}$ furent appliqués à raison de 10 mV . **B.** Panneaux a et b, respectivement, montrent les courbes IV pour le courant instantané et soutenu enregistrés en absence (losanges noirs, $n=6$) ou en présence (losanges verts, $n=5$) de CsA. La différence entre les deux conditions était significative pour le courant instantané (a) avec $P < 0.05$ pour tous les potentiels positifs à $+50 \text{ mV}$, et pour le courant soutenu (b) avec $P < 0.05$ pour tous les potentiels positifs à $+70 \text{ mV}$. Les courants étaient enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV.

pA/pF) ($n=24$) en absence et en présence de CsA ($P<0.001$) dans les myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Par contre, $I_{Cl(Ca)}$ en présence de 1 μM $[Ca^{2+}]_i$, et donc complètement activé, ne fut pas influencé par la présence de CsA dans le milieu interne (figure 3.D.2-B et Cb). En effet, à +50 mV, $I_{Cl(Ca)}$ soutenu était 6.8 ± 0.8 pA/pF ($n=41$) en contrôle et 8 ± 1 pA/pF ($n=18$) avec la CsA dans la solution de pipette ($P=0.985$). Il semble que l'effet de la CsA dépende de la $[Ca^{2+}]_i$. Notons que le potentiel d'inversion de ces courants n'était pas significativement affecté par l'inclusion de CsA dans la solution de pipette pour aucune des $[Ca^{2+}]_i$ testées : avec 350 nM $[Ca^{2+}]_i$: témoin, -19 ± 5 mV ($n=6$); CsA, -27 ± 5 mV ($n=5$); avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$: témoin, -14 ± 1 mV ($n=6$); CsA, -13 ± 1 mV ($n=5$); avec 1 μM $[Ca^{2+}]_i$: témoin, -15 ± 1 mV ($n=6$); CsA, -15 ± 1 mV ($n=5$). Sans avoir fait une analyse rigoureuse, il est apparu que l'ANF (100 μM) inhibait également les composantes instantanée et soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ des cellules traitées avec CsA et dialysées avec 500 nM ($n=1$) ou 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ ($n=5$).

Nous avons procédé à une analyse approfondie des résultats précédents afin de déterminer si la modulation de $I_{Cl(Ca)}$ par CaN était affectée par le potentiel membranaire et la $[Ca^{2+}]_i$. La figure 3.D.3-Aa, b et c montre un graphique illustrant les effets de la CsA sur la conductance de $I_{Cl(Ca)}$ ($g_{Cl(Ca)}$) mesurée à la fin de sauts à différents potentiels de cellules dialysées avec 350 nM, 500 nM et 1 μM $[Ca^{2+}]_i$, respectivement. La figure 3.D.3-A montre que la CsA atténue significativement $g_{Cl(Ca)}$ dans les cellules dialysées avec 350 nM (Aa) et 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (Ab) mais que la CSA est sans effet en présence de 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ (Ac). L'impact de la CsA est également apparu dominant à des potentiels plus positifs et ceci est clairement illustré

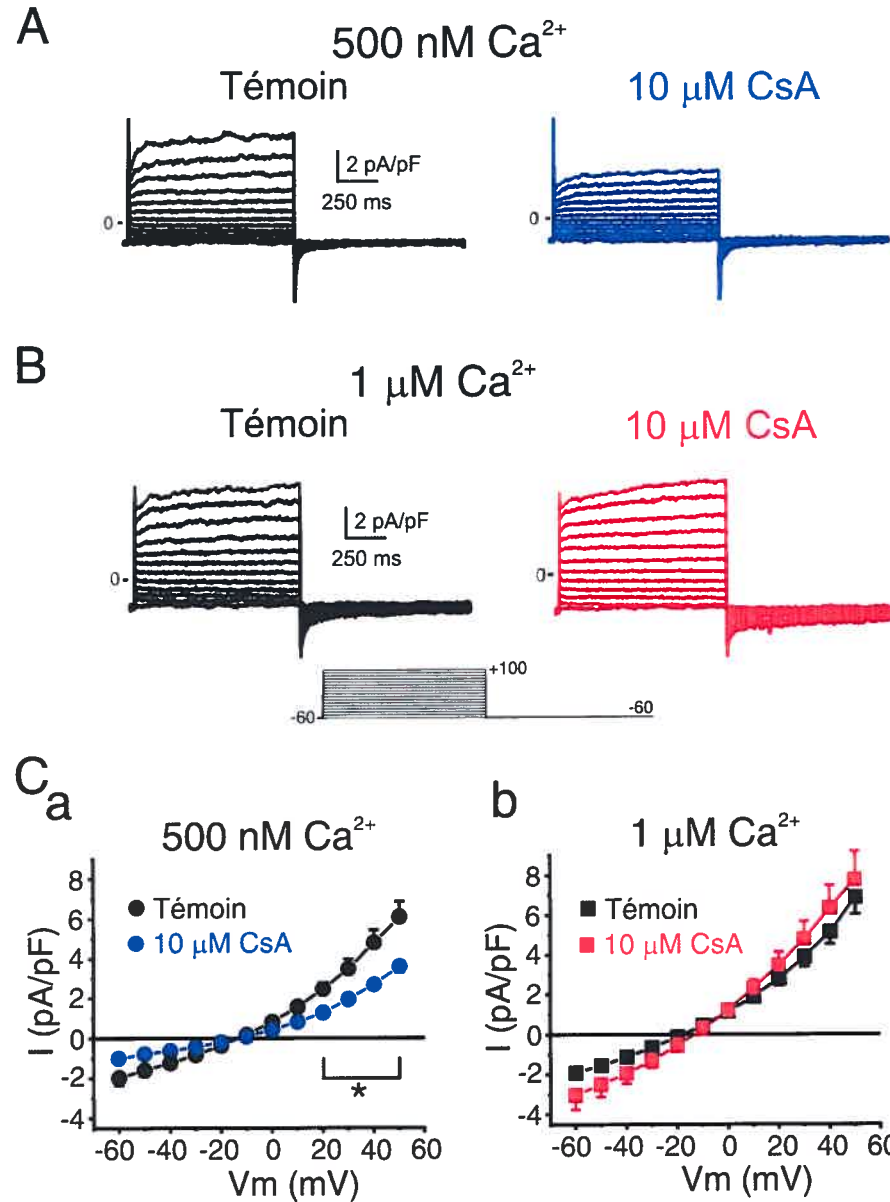


Figure 3.D.2 Effets de la cyclosporine A sur $I_{\text{C(Ca)}}$ de myocytes coronaires dialysés avec 500 nM ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$

A. Famille de tracés représentatifs de $I_{\text{C(Ca)}}$ enregistrés dans des cellules dialysées avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en absence (noir) ou en présence de 10 μM CsA (bleu) dans la solution de la pipette. À partir d'un PM = -60 mV, des sauts de potentiels (1 seconde) de -60 à +100 mV furent appliqués à raison de sauts de 10 mV suivi d'une repolarisation à -60 mV. **B.** Exemple de tracés de $I_{\text{C(Ca)}}$ enregistrées dans des cellules dialysées avec 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en absence (noir, contrôle) ou en présence de 10 μM CsA (rouge; 10 μM CsA) dans la solution de la pipette. Les courants furent induits par un protocole identique à celui présenté en A. Les courants furent enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV. **C.** Courbe I/V moyenne pour le courant soutenu enregistré en absence (symboles noirs, n=23) ou en présence (symboles de couleur, n=24) de CsA pour des cellules dialysées avec 500 nM (a) ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (b). Les différences entre les deux conditions étaient significatives avec $P < 0.05$ pour les potentiels positifs à +10 mV. Notons que pour le courant soutenu en présence de 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à -60 mV, les deux moyennes sont à la limite de la significativité ($P = 0.073$).

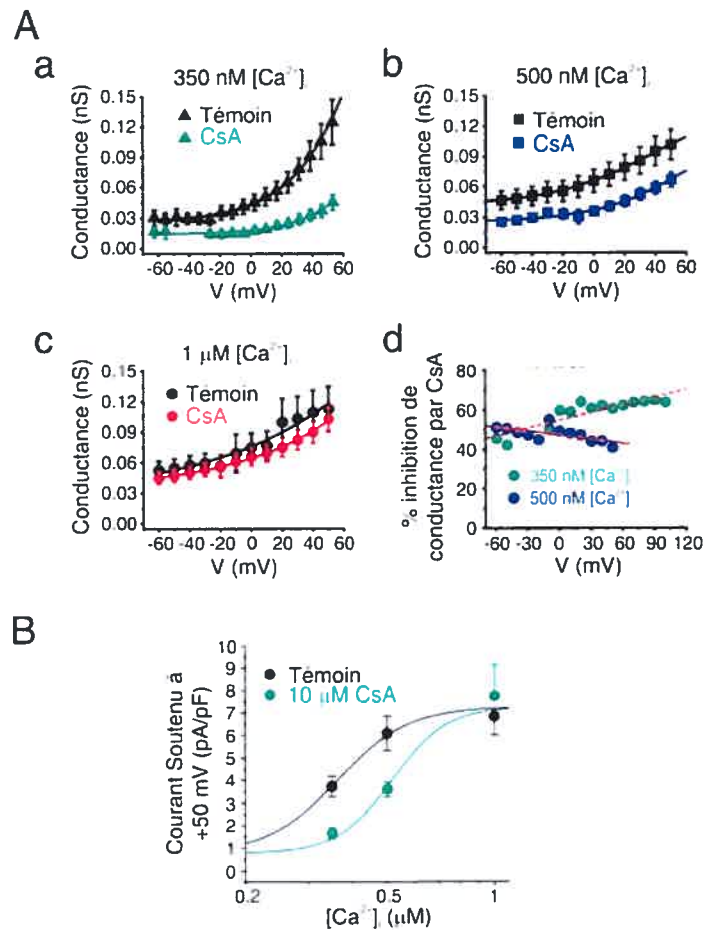


Figure 3.D.3 Effets de la cyclosporine A sur la dépendance au potentiel membranaire et au Ca^{2+} de $I_{Cl(Ca)}$

A. Panneaux a, b et c présentent des graphiques de la conductance moyenne pour $I_{Cl(Ca)}$ pleinement activé enregistrée en absence (contrôle, symboles noirs) ou présence (CsA; symboles de couleur) de CsA (10 μ M) appliqués de façon intracellulaire pour des expériences réalisées avec 350 (a), 500 nM (b) ou 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ (c) tel qu'indiqué. Les données furent extraites des expériences décrites dans les figures 3.D.1 et 3.D.2. La conductance $g_{Cl(Ca)}$ dans chaque cellule était calculée en utilisant l'équation suivante : $I/(V - E_{rev})$ où I est le courant soutenu, V le voltage imposé et E_{rev} le potentiel d'inversion du courant. Dans chacun des panneaux, les deux séries de points suivent une fonction exponentielle simple (lignes pleines). **Panneau d** présente un graphique rapportant la dépendance au potentiel de l'inhibition de $g_{Cl(Ca)}$ induite par CsA pour les expériences réalisées avec 350 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Les données obtenues avec 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ ne furent pas incluses (vert) puisque la CsA (bleu) n'a produit aucun effet significatif sur $I_{Cl(Ca)}$. Les lignes pointillées et pleines suivent respectivement une fonction linéaire des moindres carrés avec 350 et 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ avec les paramètres suivants : 350 nM $[Ca^{2+}]_i$: $y = -0.069x + 47.27$ ($P = 0.0197$; $r^2 = 0.435$); 500 nM $[Ca^{2+}]_i$: $y = 0.131x + 54.75$ ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.778$). **B.** Graphique montrant la courbe dose-réponse au Ca^{2+} à +50 mV en absence (cercles noirs) ou présence de 10 μ M CsA (symboles verts). Les points sont la moyenne d'entre 6 et 41 cellules enregistrées les mêmes jours. Les valeurs en contrôle sont tirées de la figure 3.A.6. Les lignes suivent une relation sigmoïdale pour chaque point en utilisant la fonction logistique : $y = (A_1 - A_2) / [1 + (X/X_0)^p] + A_2$ avec les paramètres calculés suivants : contrôle (cercles noirs) : $A_1 = 0.785$, $A_2 = 7.25$, $X_0 = 0.36 \pm 0.02$, $p = 4 \pm 1$ et CsA (cercles verts) : $A_1 = 0.785$, $A_2 = 7.25$, $X_0 = 0.51 \pm 0.04$, $p = 6 \pm 3$.

à la figure 3.D.3-Ad qui présente un graphique de la dépendance au voltage de l'inhibition par la CsA de $g_{Cl(Ca)}$ pour ces deux séries d'expériences. Dans les deux cas, la CsA a altéré significativement la conductance associée aux canaux Cl^- activés par le Ca^{2+} d'une manière qui varie en fonction du potentiel membranaire. Toutefois, il est intéressant de noter que l'effet de la CsA présente des relations opposées au potentiel dans les deux groupes : avec 350 nM $[Ca^{2+}]_i$, le pourcentage d'inhibition par CsA augmente linéairement de ≈ 45 à 65% entre -60 et $+100$ mV ($P=0.0197$; $r^2 = 0.44$), alors qu'avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, cette inhibition décline, bien que faiblement, suivant une relation linéaire de ≈ 52 à 43% entre -60 et $+50$ mV ($P < 0.0001$; $r^2 = 0.78$). Ces résultats indiquent que la modulation de $I_{Cl(Ca)}$ par la CaN est influencée par le voltage bien que la dépendance au voltage de ce mécanisme soit relativement modeste.

Les résultats présentés ci-haut suggèrent que la dépendance au potentiel de la modulation de $I_{Cl(Ca)}$ puisse également être influencée par la $[Ca^{2+}]_i$. Afin de vérifier cette possibilité, nous avons fait un graphique de l'amplitude de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à $+50$ mV en absence et en présence de CsA (données des figures 3.A.6, 3.D.1 et 3.D.2) en fonction de la concentration en Ca^{2+} de la pipette (figure 3.D.3-B). En conditions témoins (cercles noirs), la $[Ca^{2+}]_i$ active $I_{Cl(Ca)}$ avec une EC_{50} de 363 ± 20 nM (voir *Section 3.A*). En accord avec une altération de la sensibilité au Ca^{2+} par la CaN, la CsA (cercles verts) induit un déplacement vers la droite de la dépendance au $[Ca^{2+}]_i$ de $I_{Cl(Ca)}$ avec une EC_{50} de 512 ± 40 nM, soit un déplacement de 149 nM.

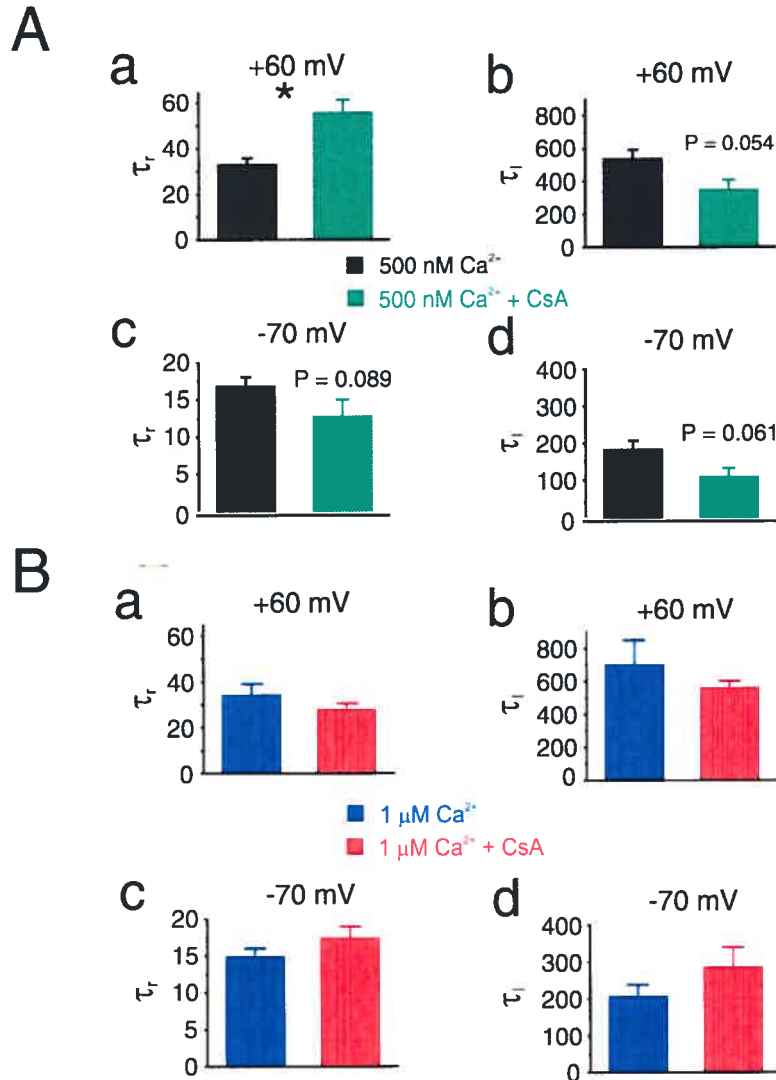


Figure 3.D.4 Effets de la cyclosporine A sur les cinétiques d'activation et de déactivation de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes dialysés avec 500 nM et 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$

A. *Panneaux a et b* présentent des histogrammes rapportant les constantes de temps moyennes pour les composantes rapides (τ_r ; a) et lentes (τ_l ; b) de l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ à +60 mV de myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (colonnes noires, n=21) ou en présence (colonnes vertes, n=10) de 10 μ M CsA. La différence entre les deux conditions était significative pour la composante rapide de l'activation avec $P < 0.05$. *Panneaux c et d* montrent des histogrammes rapportant les constantes de temps moyennes pour les composantes rapides (τ_r ; c) et lentes (τ_l ; d) de la déactivation de $I_{Cl(Ca)}$ à -70 mV de myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (colonnes noires, n=16) ou en présence (colonnes vertes, n=9) de 10 μ M CsA. **B.** *Panneaux a et b* montrent des histogrammes rapportant les constantes de temps moyennes pour les composantes rapides (τ_r ; a) et lentes (τ_l ; b) de l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ à +60 mV de myocytes dialysés avec 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ en absence (colonnes bleues, n=16) ou en présence (colonnes rouges, n=11) de 10 μ M CsA. *Panneaux c et d* montrent des histogrammes rapportant les constantes de temps moyennes pour les composantes rapides (τ_r ; c) et lentes (τ_l ; d) de la déactivation de $I_{Cl(Ca)}$ à -70 mV de myocytes dialysés avec 1 μ M $[Ca^{2+}]_i$ en absence (colonnes bleues, n=26) ou en présence (colonnes rouges, n=9) de 10 μ M CsA. Les courants furent enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV.

D'autre part, la figure 3.D.4 rapporte les constantes rapides (τ_r) et lentes (τ_l) d'activation et de désactivation moyennes pour les expériences réalisées avec 500 nM (figure 3.D.2) ou 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.D.2), en absence (colonnes noires et bleues) ou en présence de CsA (colonnes vertes et rouges). Avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.D.4-A), la CsA augmenta significativement τ_r à +60 mV. Par contre, τ_l fut apparemment réduite par la présence de CsA, un effet qui est tout juste en deçà de la limite de la significativité. De plus, tant τ_r que τ_l tendent à être réduits par la CsA bien qu'encore une fois ce ne soit pas significatif à -70 mV. Par contre, CsA n'eut aucun effet sur les cinétiques de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ à +60 mV ni à -70 mV pour les cellules dialysées avec 1 μM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.D.4-B), un résultat en accord avec l'absence d'effet de la CsA sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ à cette $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (figure 3.D.3C et D).

Effets d'un peptide inhibiteur spécifique à la calcineurine sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$

Afin de valider notre hypothèse principale selon laquelle une déphosphorylation par la CaN augmente $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$, nous avons également examiné l'effet d'une application intracellulaire d'un fragment peptidique synthétique (CaN-AF, 5 μM) reconnu pour inhiber spécifiquement la CaN. La concentration du peptide utilisé avoisine l' IC_{50} pour inhiber la déphosphorylation du fragment peptidique phosphorylé RII par la CaN *in vitro* ($\text{IC}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$; (Perrino *et al.*, 2002)). La figure 3.D.5 présente des courbes *IV* pour les composantes instantanée (A) et soutenue (B) de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ enregistré après cinq minutes de dialyse cellulaire en absence (témoin) ou en présence de 5 μM CaN-AF de myocytes coronaires. Ce temps de dialyse fut amplement suffisant pour observer des effets significatifs sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ avec l'ARIP

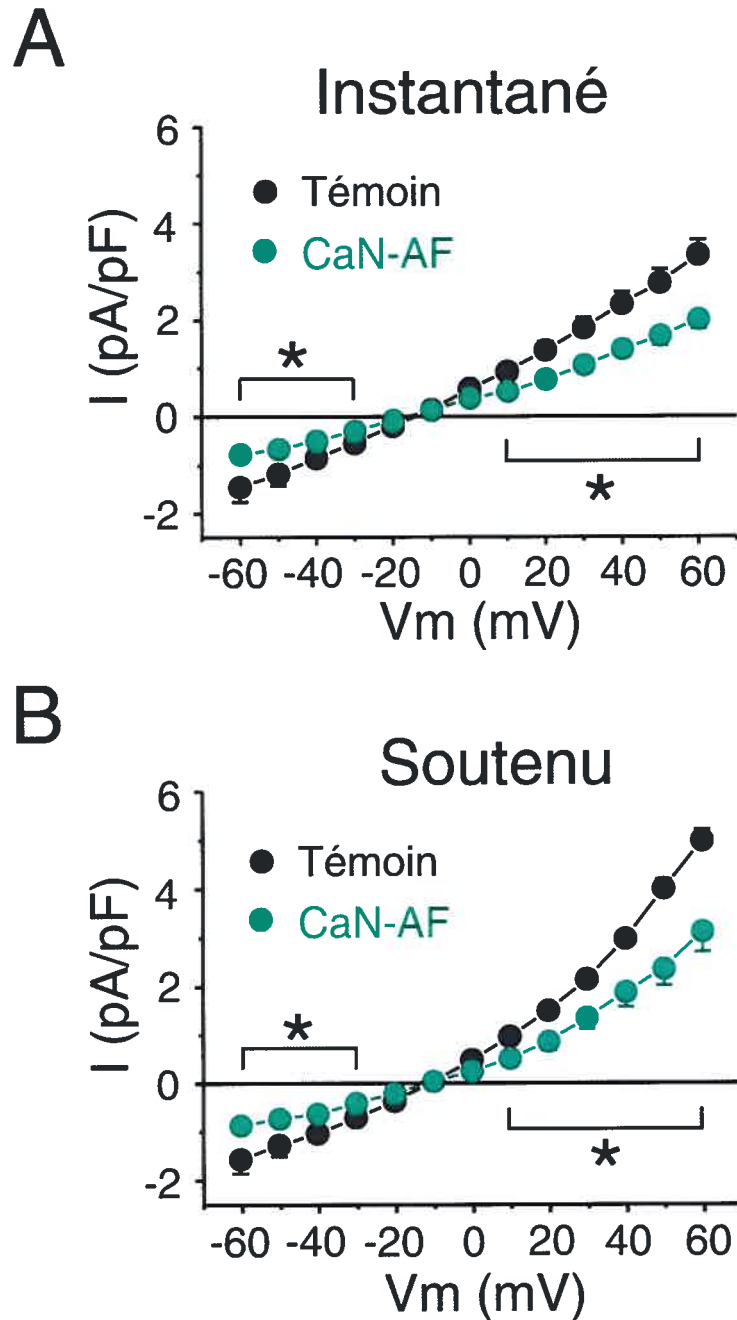


Figure 3.D.5 Effets d'un peptide inhibiteur hautement sélectif pour la CaN sur $I_{Cl(Ca)}$

Effets de l'inclusion dans la solution de la pipette d'un fragment auto-inhibiteur de CaN (CaN-AF; 5 μ M) sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes exposés à 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Les courants furent enregistrés le même jour en alternance entre des cellules dialysées seulement avec la solution de pipette (témoin) ou avec le peptide. Tous les courants furent enregistrés après au moins 5 minutes suivant l'obtention de l'accès au milieu intracellulaire. A et B montrent respectivement les courbes IV moyennes pour le courant instantané et soutenu enregistrés en absence (cercles noirs, $n=11$) ou en présence (cercles verts, $n=7$) de CaN-AF. La différence entre les deux conditions est significative pour le courant instantané (A) avec $P < 0.05$ pour tous les potentiels plus positifs que 0 mV et plus négatifs que -20 mV et pour le courant soutenu (B) avec $P < 0.05$ à tous les potentiels à l'exception de 0 et -10 mV. Les courants furent enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV.

(figure 3.C.8, voir *Section 3.C*) ou encore la forme constitutivement active de CaMKII tel que précédemment démontré (figure 3.C.9, voir *Section 3.C*). Comme pour les expériences avec la CsA appliquée de façon intracellulaire, les courants de différentes cellules furent enregistrés durant la même journée d'expériences en alternant entre les solutions de pipette contenant ou non le peptide inhibiteur. L'application intracellulaire de CaN-AF avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ réduisit significativement $I_{Cl(Ca)}$, à une gamme de potentiels membranaires physiologiques, à un degré comparable à ce qui fut observé en présence de CsA dans le cytoplasme (comparer avec figure 3.D.2-Ca). La figure 3.D.6 présente deux exemples d'expériences pour lesquels le courant soutenu mesuré à +90 mV fut enregistré durant l'application externe de 10 μ M CsA (indiqué par les flèches) de cellules dialysées avec (+) ou sans (-) CaN-AF. Alors qu'une réduction de $I_{Cl(Ca)}$ fut enregistrée après deux à trois minutes d'exposition au CsA en absence de CaN-AF dans la solution de la pipette (figure 3.D.6-Aa, haut), la CsA ne parvint pas à inhiber le courant lorsque le peptide inhibiteur fut inclus dans la solution de la pipette (figure 3.D.6-Ab). La figure 3.D.6-B montre un histogramme rapportant les valeurs moyennes de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ regroupant 7 ou 11 expériences semblables à celles montrées à la figure 3.D.6-A. Alors que l'application externe de CsA ne causa aucun effet sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes dialysés avec le peptide, la présence de CaN-AF dans la pipette diminua significativement ($P < 0.01$) les composantes instantanée (données non représentées) et soutenue (figure 3.D.6-B) de $I_{Cl(Ca)}$. Le potentiel d'inversion des courants mesurés ne fut encore une fois aucunement affecté de façon significative par la présence de CaN-AF dans la pipette : témoin, $E_{rev} = -13$

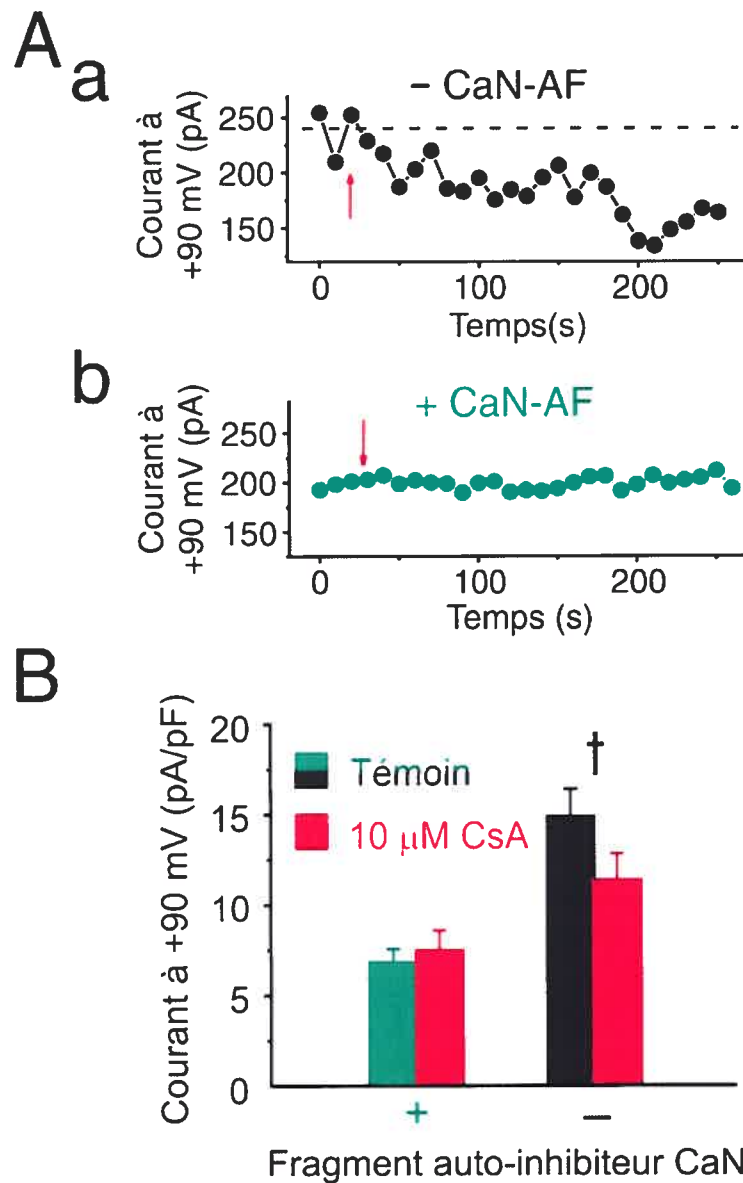


Figure 3.D.6 Effets de l'exposition extracellulaire de myocytes à la CsA sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence et en absence de CaN-AF

A. Exemples d'expériences démontrant les effets de l'application externe de CsA (CsA, 10 μ M, flèches rouges) de cellules dialysées avec une solution de pipette contenant (b, vert) ou non (a, noir) le peptide inhibiteur CaN-AF (5 μ M). Chaque point représente la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à la fin d'un pulse de 1 seconde à +90 mV à partir d'un PM de -60 mV; les sauts furent appliqués à une fréquence de 0.1 Hz. **B.** Histogramme rapportant l'amplitude moyenne du courant soutenu de $I_{Cl(Ca)}$ à +90 mV de cellules exposées à 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (-, n=7) ou en présence de CaN-AF (+, n=6) pour des expériences semblables à ce qui est présenté en A. Les courants furent enregistrés avant (colonnes noires et vertes) et 5 minutes suivant l'application extracellulaire de 10 μ M CsA (colonnes rouges). Les différences entre le témoin et CsA furent significatives avec $P < 0.01$ (†) pour les myocytes en absence de CaN-AF. Les courants furent enregistrés à 30°C et en utilisant les solutions D et IV.

± 1 mV ($n=7$); CaN-AF, $E_{rev} = -12 \pm 1$ mV ($n=11$). Ces résultats appuient donc l'hypothèse que la CaN augmente l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ dans les myocytes d'artères coronaires.

Effets de la CaN sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères pulmonaires

Comme pour l'AC, l'inhibition de CaMKII induit une augmentation de $I_{Cl(Ca)}$ dans les myocytes d'AP (Section 3.C). Nous avons donc entrepris d'évaluer si, comme c'est le cas pour l'AC, la CaN est impliquée dans la régulation de $I_{Cl(Ca)}$ d'AP. La figure 3.D.7-A montre que l'inclusion d'une forme constitutivement active de la sous-unité α de la CaNA dans la pipette réduit la perte d'activité de Cl_{Ca} en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ suivant la rupture de la membrane sous la pipette de « patch » et la dialyse de la cellule. D'ailleurs, 6 minutes après le début de la dialyse, les composantes instantanée et soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ étaient nettement supérieures en présence de CaNA α comparativement aux valeurs obtenues en absence de l'enzyme (à +90 mV, 17 ± 5 et 47 ± 8 pA/pF en absence et en présence de 500 nM CaNA α , respectivement, $n=8$ et 6). Les cinétiques d'activation et de désactivation de $I_{Cl(Ca)}$ sont également affectées puisque après six minutes de dialyse, le taux d'activation du courant est accru (τ_{act} à +130 mV, 421 ± 29 ms et 260 ± 33 ms en absence et en présence de 500 nM CaNA α active, respectivement $P=0.003$, $n=8$) alors que le taux de fermeture des canaux est ralenti ($\tau_{désact}$ à -80 mV, 70 ± 5 ms et 96 ± 7 ms en absence et en présence de l'enzyme, respectivement, $P=0.014$) par la présence de CaNA α active dans le cytoplasme. De plus, pour les expériences où $I_{Cl(Ca)}$ est mesuré jusqu'à 20 minutes, on note que la perte d'activité

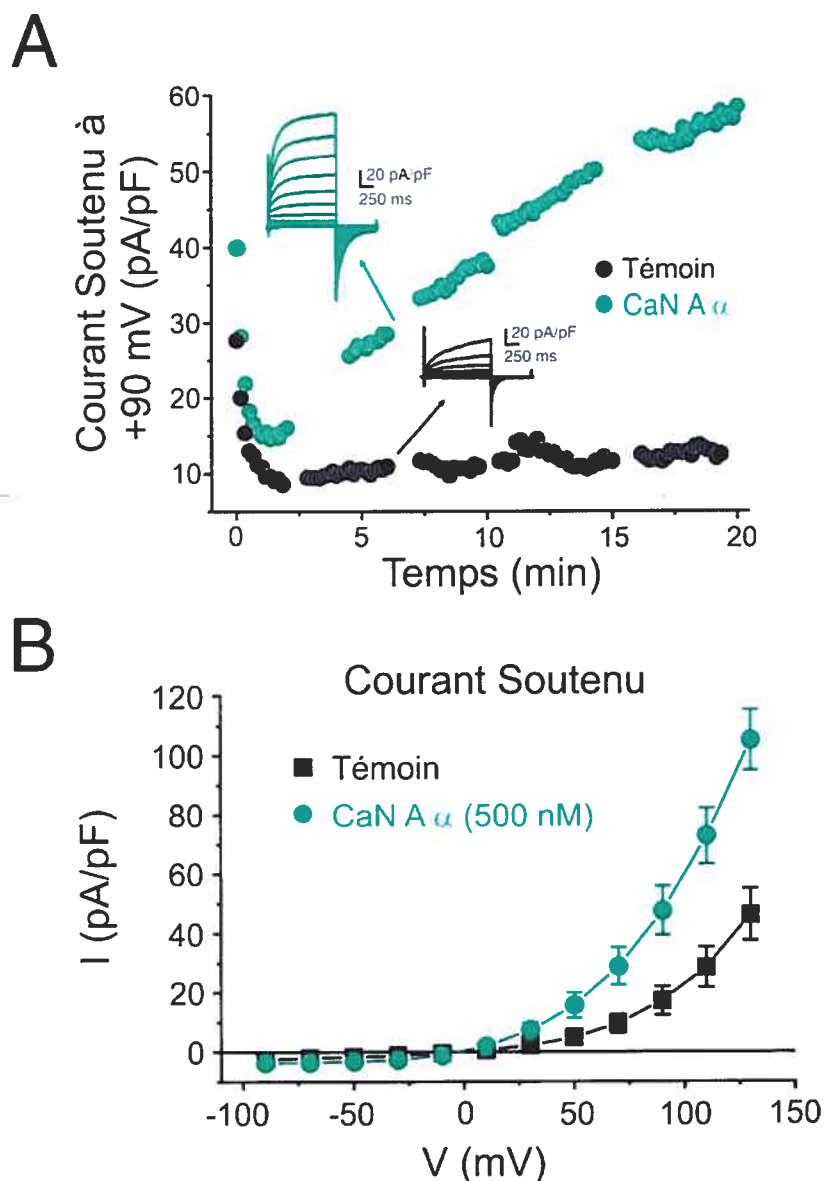


Figure 3.D.7 Effets de la dialyse de CaN constitutivement active sur $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'AP

A. Décours temporel de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes d'artères pulmonaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en absence (témoin, noir) et en présence (CaNA α , vert) d'une forme constitutivement active de l'isoforme α de la sous-unité A de la calcineurine. Le courant fut obtenu par une dépolarisation de 1.25 s à +90 mV à partir d'un PM = -50 mV. *Encarts* Exemples de traces de $I_{Cl(Ca)}$ des cellules en absence (noir) ou en présence (vert) de CaNA α active dans la solution de pipette. Les relations IV furent enregistrées 6 minutes après la rupture du patch et pour des dépolarisations de 1.25 s allant de -90 à +110 mV à raison de sauts de +20 mV suivie d'une repolarisation à -80 mV pour 750 ms. **B.** Relations courant-potentiel membranaire moyennes du courant soutenu de $I_{Cl(Ca)}$ selon les protocoles de l'encart en A enregistrés 6 minutes suivant l'obtention de l'accès de cellules dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ libre en absence (témoin, noir) ou en présence de CaNA α active (CaNA α , vert). Les courants furent enregistrés à 23°C et en utilisant les solutions B et II.

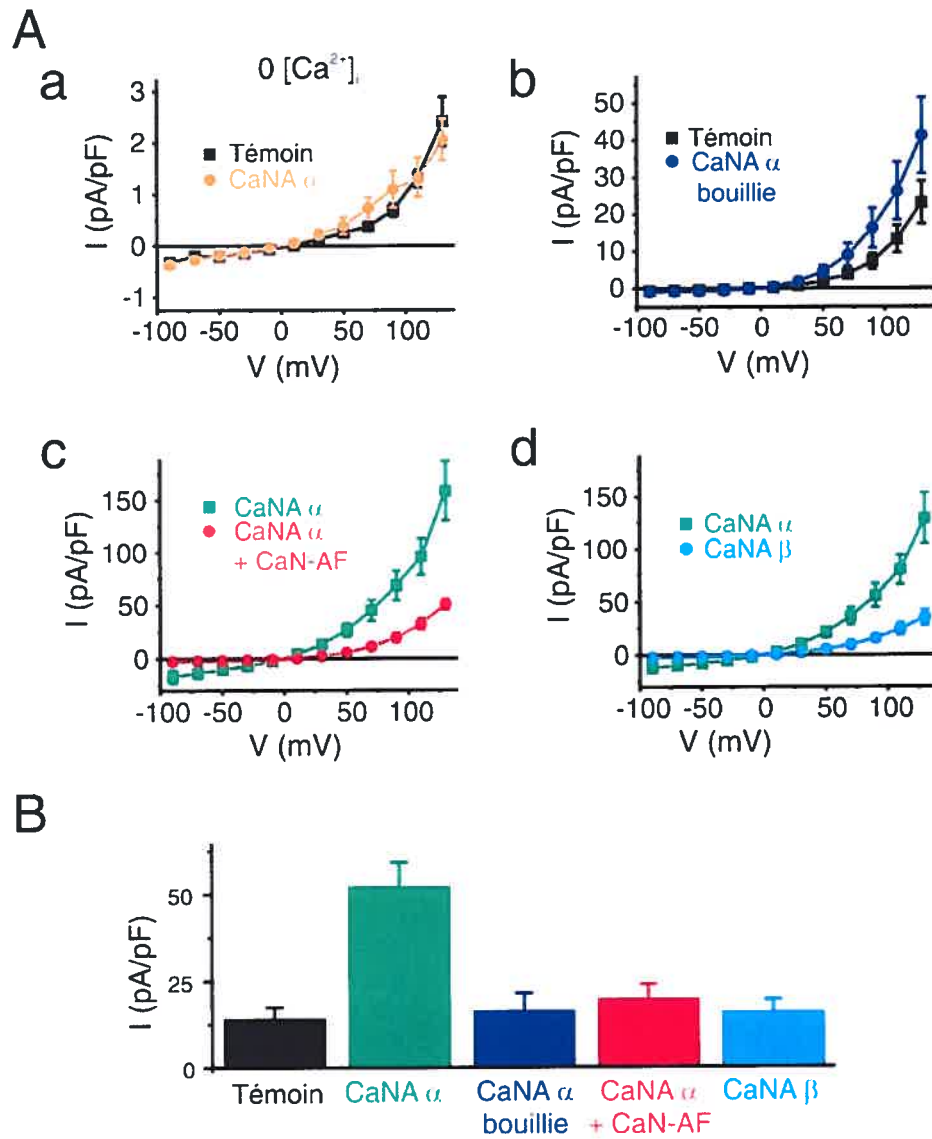


Figure 3.D.8 Effet isoforme-spécifique de la CaNA sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artère pulmonaire

A. *Panneau a* présente les relations courant-voltage de $I_{Cl(Ca)}$ de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires dialysées avec une solution contenant 10 mM BAPTA et sans l'ajout de Ca^{2+} en absence (noir, témoin) ou en présence de 500 nM CaNA α (CaNA α , orange). *Panneau b* présente les courbes IV de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]$ libre sans (témoin, noir) ou avec l'inclusion de CaNA α préalablement bouillie (10 minutes) dans la solution de pipette. *Panneaux c et d* présentent comme b, à l'exception que la présence de peptide inhibiteur (c) (CaN-AF, rouge; 500 nM) ou de CaNA β (d, bleu pâle; 500 nM) est comparée à la présence de CaNA α dans la pipette. **B.** Histogramme rapportant la densité de courant moyenne de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à +90 mV de myocytes dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]$ seulement (témoin), en présence de CaNA α (vert), CaNA α bouillie (bleu), CaNA α et peptide inhibiteur (rouge) ou de CaNA β (bleu pâle). $n=4-12$. Les courants furent enregistrés à 23°C et en utilisant les solutions B et II.

est complètement renversée par l'inclusion de l'enzyme dans la pipette (figure 3.D.7), ce qui fut observé dans 6 des 8 expériences réalisées.

La spécificité de l'effet observé par l'inclusion d'une forme active de CaN α fut étudiée en dialysant les myocytes d'AP avec la même enzyme préalablement bouillie afin d'en retirer ses propriétés actives. La figure 3.D.8-Ab démontre que le courant enregistré suite à la dialyse de l'enzyme rendue inactive n'est pas significativement différent de celui en absence de la protéine (à +90 mV, 7 ± 2 et 16 ± 6 pA/pF, en absence et en présence de CaN α bouillie, respectivement, $n=4$). De plus, l'ajout d'un peptide correspondant au segment auto-inhibiteur de la CaNA (CaN-AF) afin d'inhiber l'enzyme activée réduisit de façon significative l'habileté de la CaNA α à augmenter $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'AP en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ tel qu'illustré par la figure 3.D.8-Ac. La densité de courant de la composante soutenue de $I_{Cl(Ca)}$ à +90 mV de myocytes d'AP en présence de CaNA α seule était de 68 ± 14 pA/pF ($n=6$) et de 19 ± 4 pA/pF ($n=5$) en présence de CaN-AF, respectivement. Il est intéressant de noter que la dialyse de la forme active de la sous-unité β de la CaNA n'a eu aucun effet sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ (figure 3.D.8- Ad). D'autre part, la dialyse de l'enzyme n'a eu aucun effet sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence d'une solution de pipette contenant 10 mM BAPTA et sans l'ajout de Ca^{2+} malgré le fait que l'enzyme dialysée soit active indépendamment du niveau de $[Ca^{2+}]_i$ (figure 3.D.8-Aa). Cette expérience révèle également que la déphosphorylation par la CaN n'est pas suffisante pour stimuler $I_{Cl(Ca)}$ et établit que la CaN est un régulateur important de l'activité des Cl_{Ca} , mais n'est pas nécessaire à l'activation du canal. De fait, $I_{Cl(Ca)}$ n'était pas différent 6 minutes après le début de la dialyse qu'il soit

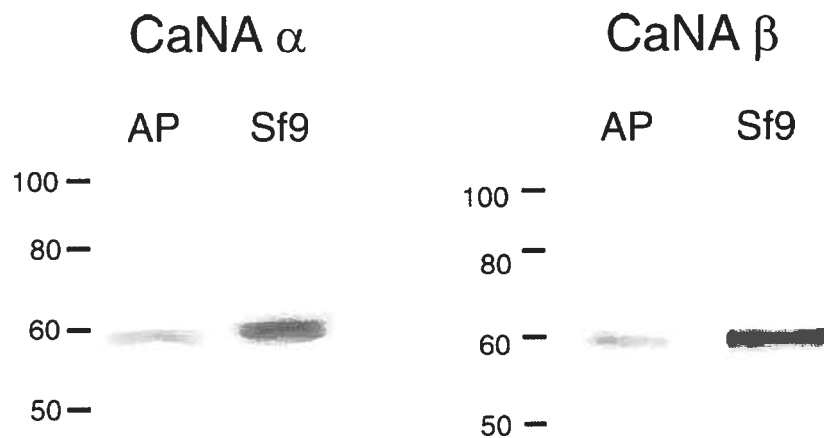


Figure 3.D.9 Immunobuvardage de CaNA α et β dans le muscle lisse d'artères pulmonaires

L'immunobuvardage fut réalisé en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre CaNA α ou CaNA β sur des lysats d'artères pulmonaires (AP, 50 μ g) et de CaNA α (1 μ g) ou CaNA β (0.5 μ g) exprimées dans des cellules Sf9 et purifiées (Sf9).

enregistré en absence ou en présence de CaNA β , en présence de CaNA α bouillie ou de CaNA α fonctionnelle et d'un peptide inhibiteur de CaN (figure 3.D.8-B). Le niveau relatif d'expression de chacune des deux isoformes (α et β) de la CaNA dans les myocytes fraîchement isolés d'AP fut ensuite évalué par immunobuvardage en utilisant des lysats d'AP préalablement dénudées d'endothélium. L'immunobuvardage en utilisant des anticorps spécifiques pour les isoformes α et β démontra la présence des deux isoformes dans les myocytes d'AP (figure 3.D.9). De plus, la comparaison avec comme étalon des isoformes purifiées démontra qu'approximativement 0.56 μ g et 0.3 μ g de CaNA α et β respectivement, sont présents dans les échantillons d'AP dénudée de son endothélium. Par conséquent, les

myocytes d'AP expriment à la fois l'isoforme α et β de CaNA avec une prédominance pour la forme α .

Translocation isoforme-spécifique de la CaNA en réponse à une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$

Précédemment, nous avons démontré à l'aide d'un anticorps non spécifique entre les deux isoformes de la CaNA (figure 3.C.10) une translocation de l'enzyme vers la membrane plasmique des myocytes d'artère coronaire suite à une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$. Des expériences semblables furent donc réalisées afin de déterminer si les deux isoformes (α et β) identifiées dans les cellules musculaires lisses d'AP se déplaçaient également vers la membrane suite à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Des anticorps spécifiques pour les isoformes α et β de la CaNA furent utilisés afin d'évaluer la distribution cellulaire des isoformes dans des myocytes fraîchement isolés d'AP en conditions de $[Ca^{2+}]_i$ basal et en réponse à une élévation de $[Ca^{2+}]_i$. En conditions témoins ($[Ca^{2+}]_i$ basale, sans ionophore calcique), les deux isoformes semblent distribuées de façon homogène dans le cytoplasme des myocytes d'AP (figure 3.D.10-A). D'autre part, l'exposition (15 minutes) avant fixation du myocyte à une solution contenant 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, l'ionophore calcique ionomycine (80 nM) et le ML-7 (3 μ M) avait pour but d'élever la $[Ca^{2+}]_i$ tout en prévenant la contraction de la cellule musculaire lisse. L'exposition à ce médium extracellulaire provoqua une translocation de la sous-unité α de CaNA au noyau, mais également à la membrane plasmique du myocyte sans avoir d'effet sur la sous-unité β (figure 3.D.10-A). D'ailleurs, l'analyse d'images obtenues par microscopie confocale telles que celles présentées à la figure 3.D.10-A démontre, en évaluant le rapport entre l'intensité de la

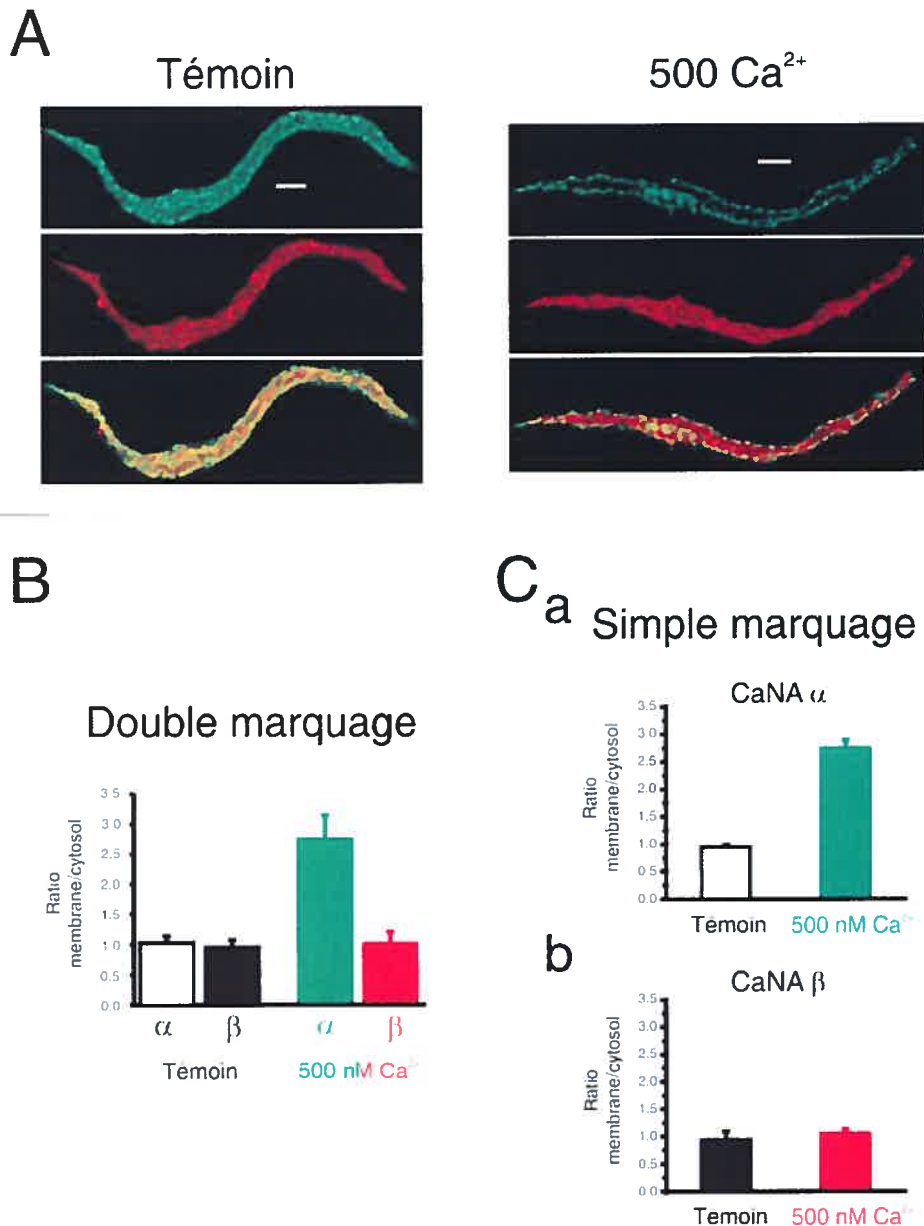


Figure 3.D.10 Translocation isoforme-spécifique de la CaNA par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Panneaux A et B présentent des images obtenues d'expériences immunocytochimiques sur des myocytes pulmonaires identifiant simultanément CaNA α (vert) et CaNA β (rouge) en utilisant des anticorps spécifiques en conditions témoins (A) ou suivant une préincubation en présence d'ionomycine (80 nM), de ML-7 (3 μM) et 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre pendant 15 minutes précédant la fixation afin d'augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ligne de calibration : 100 μm . Panneau C illustre le ratio de l'intensité de fluorescence du cytoplasme sur celle à la membrane de coupes transversales d'images obtenues lors d'expériences semblables à celles décrites en A et B. Les histogrammes représentent les résultats moyens d'expériences où les anticorps dirigés contre la CaNA α et β furent appliqués individuellement (Ca) ou simultanément (Cb). Simple marquage : CaNA α: Témoin, n=4, 500 nM Ca^{2+} , n=6; CaNA β: Témoin, n=5, 500 nM Ca^{2+} , n=5; et Double marquage: Témoin, n=4, 500 nM Ca^{2+} , n=5.

fluorescence à la membrane à celle du cytoplasme, un accroissement de la fluorescence associée à CaNA α à la membrane suite à l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ sans avoir d'effet sur CaNA β et ce, que les expériences soient réalisées en marquages individuels (figure 3.D.10-C) ou simultanés (figure 3.D.10-B). Ces résultats sont en accord avec nos résultats précédents suggérant une régulation de $I_{Cl(Ca)}$ par la sous-unité α , mais pas par la sous-unité β de la CaNA.

Chapitre 4 : Discussion

<i>Section 4.A : Caractérisation du courant anionique des myocytes vasculaires</i>	181
<i>Section 4.B : Étude dynamique des effets de l'Acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin</i>	187
<i>Section 4.C : Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII</i>	197
<i>Section 4.D : Stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels de lapin par la calcineurine</i>	204

Section 4.A - Caractérisation du courant anionique de cellules musculaires lisses vasculaires

En absence de K^+ dans les milieux intra- et extracellulaires, la dialyse de cellules musculaires lisses vasculaires avec une solution contenant une $[Ca^{2+}]_i$ libre et fixe permet non seulement l'activation d'un courant sortant suite à une dépolarisation supérieure à +10 mV, mais également celle d'un courant entrant au potentiel membranaire de repos (-50 mV). L'utilisation d'une pipette contenant un chélateur calcique, tel que l'EGTA ou le BAPTA, en forte concentration (10 mM) dans le but de maintenir le niveau de Ca^{2+} libre du cytoplasme à une valeur stable et connue. Par conséquent, il est possible d'étudier les propriétés de canaux ioniques sensibles au Ca^{2+} intracellulaire à $[Ca^{2+}]_i$ constante. Quoiqu'il en soit, ce courant enregistré en présence de $[Ca^{2+}]_i$ arbore plusieurs caractéristiques propres aux courants générés par les canaux Cl_{Ca} tel que démontré dans d'autres types tissulaires (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000; Large *et al.*, 2002). Tout d'abord, il présente des cinétiques d'activation et de désactivation lentes qui suivent, dans les myocytes vasculaires, une fonction exponentielle simple. De plus, la relation entre la densité de courant soutenu et le potentiel membranaire présente une rectification sortante alors que le courant instantané suit plutôt la loi ohmique et est par conséquent plus linéaire. D'un point de vue pharmacologique, lorsque le myocyte est dialysé avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, ce courant est inhibé par l'exposition à l'acide niflumique (100 μ M), un agent pharmacologique considéré comme étant le plus puissant inhibiteur de Cl_{Ca} .

Le potentiel d'inversion du courant généré dans nos conditions correspond au potentiel d'équilibre théorique des ions Cl^- prédit par l'équation de Nernst et ce,

même en modifiant les conditions dans lesquelles le courant était étudié (différentes solutions internes et externes et modification de la température). De plus, le remplacement du NaCl du perfusat par le NaSCN, le SCN^- étant plus perméable que le Cl^- , a produit un déplacement du potentiel d'inversion vers des valeurs plus négatives, tel que prévu. Ceci démontre donc que le courant observé résulte d'un mouvement de charge anionique.

D'autre part, le courant anionique est sensible à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ imposé par la dialyse de solution tamponnée en Ca^{2+} . En fait, la présence de Ca^{2+} dans le cytoplasme est nécessaire puisque aucun courant ne fut enregistré dans les myocytes coronaires et pulmonaires dialysés avec une solution contenant 10 mM EGTA ou BAPTA et où aucun Ca^{2+} ne fut ajouté. Également, l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a augmenté l'amplitude du courant Cl^- , démontrant ainsi la dépendance au $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de cette conductance.

Par conséquent, le courant sortant enregistré suite à une dépolarisation de myocytes vasculaires dialysés avec une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ possède les caractéristiques des canaux Cl_{Ca} enregistrés dans d'autres types tissulaires avec la même technique.

Les courants générés par l'activité des canaux Cl_{Ca} peuvent donc être observés tant dans les myocytes d'artères coronaires et pulmonaires que de la veine porte de lapin. Par contre, il semble qu'une différence majeure distingue les myocytes artériels et veineux. Nos résultats démontrent en effet que le nombre de cellules exprimant ce courant est nettement inférieur dans la veine porte comparativement aux tissus artériels bien qu'il présente les mêmes propriétés biophysiques et pharmacologiques peu importe l'origine du myocyte vasculaire. Cette différence

entre les préparations cellulaires peut exprimer une importance physiologique différente selon le lit vasculaire. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer que seule une fraction des myocytes de la veine porte ($\leq 50\%$) expriment un courant $I_{Cl(Ca)}$. Par exemple, la veine porte peut être composée de différentes populations hétérogènes de cellules. Également, il est possible que l'important « run-down » observé immédiatement suivant la rupture de la membrane de « patch » lors de la dialyse de $[Ca^{2+}]_i$ fixe puisse, en partie, expliquer cette faible expression fonctionnelle de $I_{Cl(Ca)}$ observée dans la veine porte. Toutefois, il est à noter que d'autres techniques électrophysiologiques moins invasives pour le cytoplasme et l'intégrité cellulaire (influx calcique et caféine) ont également révélé une expression fonctionnelle inférieure de $I_{Cl(Ca)}$ dans le tissu veineux. Une autre hypothèse est que $I_{Cl(Ca)}$ est sous une plus forte influence inhibitrice dans les myocytes de la veine porte que dans les cellules musculaires lisses artérielles impliquant d'autres protéines régulatrices absentes ou moins importantes dans le tissu artériel. La réciproque est aussi probable, impliquant que des protéines nécessaires à l'activité de Cl_{Ca} soient absentes ou plus faiblement exprimées dans le tissu veineux qu'artériel. Il est également possible que la protéine formant le canal Cl_{Ca} soit elle-même soumise à une expression génique différentielle selon le lit vasculaire. Toutefois, de telles hypothèses ne pourront être vérifiées que subséquemment à l'identification moléculaire du canal.

D'autre part, $I_{Cl(Ca)}$ enregistré dans les myocytes d'artères pulmonaires présente une plus grande composante du courant macroscopique en fonction du temps que les myocytes coronaires tel qu'en fait foi un courant soutenu supérieur tout en ayant un courant instantané semblable de cellules en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$.

Toutefois, des études supplémentaires telle qu'une analyse de bruit seront nécessaires afin d'évaluer si cette différence peut s'expliquer par un recrutement de canaux silencieux ou une augmentation de la probabilité d'ouverture de Cl_{Ca} dans les myocytes d'artères pulmonaires en fonction de la dépolarisation.

Dépendance au Ca^{2+} de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes coronaires

L'activation de $I_{Cl(Ca)}$ nécessite la présence de Ca^{2+} en quantité suffisante dans le cytoplasme de la cellule musculaire lisse coronaire. Nous avons donc tenté d'évaluer la corrélation entre l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ et la $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes coronaires. Tel qu'escompté, en absence de Ca^{2+} dans le cytoplasme, aucun courant $I_{Cl(Ca)}$ ne fut enregistré. Toutefois, une augmentation de la composante instantanée et soutenue fut observée en réponse à une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$. D'ailleurs, à +50 mV, le courant généré en présence de différentes $[Ca^{2+}]_i$ suit une relation sigmoïdale de type dose-réponse. De cette équation, nous avons extrait la valeur de EC_{50} du canal pour le Ca^{2+} (EC_{Ca50}), soit 363 ± 20 nM qui suggère également l'apport d'au moins 4 ions calciques à l'activation maximale de Cl_{Ca} tel que révélé par la puissance (p) de la relation sigmoïdale. Cette valeur d' EC_{50} est pratiquement identique à celle obtenue par des mesures de $[Ca^{2+}]_i$ (365 nM) effectuées à l'aide du marqueur calcique Indo-1 dans la veine porte de rat (Pacaud *et al.*, 1992) et dans les cellules acinaires de rat (300-370 nM) (Arreola *et al.*, 1996; Giovannucci *et al.*, 2002). Malgré une certaine discordance entre ces résultats et ceux obtenus dans les CML de trachée équine (468 nM) ou des cellules PAC (620 nM), l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes coronaires par le Ca^{2+} est semblable à celle retrouvée dans les autres types tissulaires. Notons

toutefois que la dépendance de l' E_{Ca50} au voltage n'a pu être évaluée. L'amplitude des courants $I_{Cl(Ca)}$ est trop faible aux potentiels membranaires négatifs testés, même à des $[Ca^{2+}]_i$ de 500 nM, pour qu'une relation sigmoïdale fiable puisse être établie.

Deux principaux modèles cinétiques ont été proposés afin de décrire la dépendance du canal à la $[Ca^{2+}]_i$ et au potentiel membranaire de $I_{Cl(Ca)}$ de cellules acinaires (Arreola *et al.*, 1996) et d'œufs de *Xenopus* (Kuruma & Hartzell, 2000). Les deux modèles diffèrent principalement dans le fait que le premier suggère que la liaison de plusieurs ions Ca^{2+} nécessaires à l'ouverture du canal soit voltage-

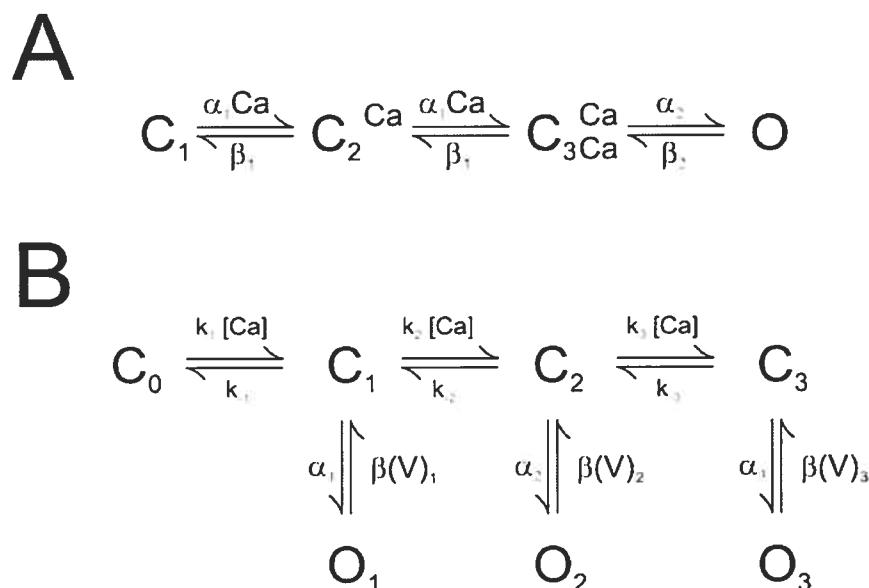


Figure 4.A.1 Modèles cinétiques de l'activation de Cl_{Ca} en fonction du potentiel membranaire et du Ca^{2+} .

A. Modèle cinétique proposé par Arreola *et al.* (1996) selon lequel la liaison de plusieurs ions Ca^{2+} est dépendante du voltage. $C_1, 2, 3$: états fermés; O : état ouvert; α_1 et β_1 : constantes de taux de transition d'étapes Ca^{2+} -dépendantes; α_2 et β_2 : constantes de taux de transition à l'état ouvert. **B.** Modèle proposé par Kuruma & Hartzell (2000) selon lequel l'ouverture du canal est contrôlée par la liaison du Ca^{2+} , étape indépendante du potentiel. Par contre, la fermeture du canal est fortement dépendante du voltage. C_x : état fermé; O_x : état ouvert; $k_x[Ca^{2+}]$ et $k_{-x}[Ca^{2+}]$: constantes de taux de transition entre les états fermés dépendantes du $[Ca^{2+}]_i$; α_x : constante de taux d'ouverture et $\beta(V)_x$: constante de taux de fermeture du canal dépendante du potentiel membranaire où x représente le niveau cinétique. Tirés de (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000).

dépendante, alors que le second implique plutôt une déactivation sensible au potentiel membranaire (figure 4.A.1). Un autre groupe a également proposé, en se basant sur des résultats obtenus dans des œufs de *Xenopus*, un modèle semblable à celui proposé par Arreola *et al.* (1996), soit une activation par le Ca^{2+} dépendante du voltage d'un canal lui-même indépendant du potentiel (Callamaras & Parker, 2000). Toutefois, Piper *et al.* (2003) ont suggéré, sur la base de résultats en canal unitaire dans l'artère pulmonaire, le modèle de Kuruma & Hartzell (2000) légèrement amendé. La différence étant que l'étape sensible au potentiel membranaire est la transition entre C_0 et C_1 , reléguant donc l'impact du voltage sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ seulement en présence de faibles $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (50 nM). Quoiqu'il en soit, nos résultats sont en accord avec tous ces modèles qui reposent sur le rôle essentiel du calcium intracellulaire dans l'activation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. Toutefois, sur la base de nos résultats, τ_{act} de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de myocytes d'AP dialysés avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$ n'est pas influencée par le potentiel membranaire, contrairement à $\tau_{\text{déact}}$, ce qui favorise le modèle proposé par Kuruma & Hartzell (2000).

Section 4.B - Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes d'artères coronaires de lapin

L'acide niflumique, un composé aromatique non-stéroïdien dérivé de l'acide N-Phénylanthranilique, est une molécule aliphatique qui fut d'abord considérée comme drogue anti-inflammatoire de par son action inhibitrice de la synthèse des prostanoïdes. Plusieurs études ont subséquemment démontré le caractère inhibiteur des fénamates sur les transporteurs ioniques comme par exemple, l'antiporteur des érythrocytes et Cl_{vol} de cellules musculaires lisses (Cousin & Motais, 1979; Greenwood & Large, 1998). De plus, l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$ est réduite par l'exposition à plusieurs fénamates tel que démontré dans différentes préparations incluant le muscle lisse et particulièrement les myocytes vasculaires de lapin (Lamb *et al.*, 1994; Piper *et al.*, 2002; Greenwood & Large, 1995; Hogg *et al.*, 1994b; Greenwood *et al.*, 1995; également démontré à la Section 3.A). En fait, l'ANF est considéré comme étant le plus puissant inhibiteur de $I_{Cl(Ca)}$ dans le muscle lisse vasculaire. L'analyse de l'inhibition dose-dépendante de $I_{Cl(Ca)}$ révéla une IC_{50} supérieure ($117 \pm 10 \mu M$) à celle déterminée par l'action inhibitrice de l'ANF sur les STICs dans la veine porte de lapin ($\approx 2-5 \mu M$; Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large, 1995). Quoiqu'il en soit, une diminution similaire de la puissance de l'ANF à inhiber $I_{Cl(Ca)}$ a aussi été notée par Piper *et al.* (2002) dans des myocytes d'artère pulmonaire de lapin dialysés avec une $[Ca^{2+}]_i$ relativement élevée (250 nM à 1 μM). Le même groupe a suggéré que la plus grande probabilité d'ouverture de Cl_{Ca} induit par une augmentation soutenue de la $[Ca^{2+}]_i$ déplace l'équilibre vers l'effet stimulant. Nos données supportent également cette hypothèse puisque l'inhibition rapide par

l'ANF était fréquemment suivie par une récupération partielle du courant, ce qui suggère que le courant net enregistré en présence d'ANF soit le produit d'une superposition de l'inhibition et de la stimulation par le composé.

Toutefois, malgré son effet inhibiteur sur $I_{Cl(Ca)}$, il fut rapporté que l'ANF inhibe également d'autres canaux possiblement présents dans les cellules musculaires lisses tels que les canaux non sélectifs aux cations, un courant cationique activé par l'hyperpolarisation (Accili & DiFrancesco, 1996) et Cl_{vol} (Greenwood & Large, 1998). De plus, l'ANF, de même que d'autres fénamates tels que l'acide méclofénamique, flufénamique et méfénamique (Greenwood & Large, 1995; Hogg *et al.*, 1994b; Gribkoff *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2001a; Ottolia & Toro, 1994) exercent une action stimulatrice sur BK_{Ca} . Kirkup *et al.* (1996) rapportent également la stimulation des canaux K_{ATP} de cellules de la veine porte de rat par l'ANF (Kirkup *et al.*, 1996). Une étude intéressante a récemment démontré un effet stimulant de l'ANF sur $I_{Cl(Ca)}$ enregistré en présence d'une $[Ca^{2+}]_i$ soutenue, ce qui semble aller à l'encontre des propriétés inhibitrices bien documentées de l'ANF (Piper *et al.*, 2002; Piper & Greenwood, 2003). De fait, dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires, $I_{Cl(Ca)}$ produit par la présence d'une solution interne contenant 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ ne fut que partiellement inhibé par 100 μM ANF. Cette observation peut s'expliquer par le fait que parallèlement à son action inhibitrice sur le courant, l'ANF active également les canaux Cl_{Ca} . De plus, une augmentation marquée de l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$, associée à une accélération des cinétiques d'activation à des potentiels positifs et un ralentissement du taux de fermeture des canaux à des potentiels négatifs, fut enregistrée suivant le retrait de l'ANF du milieu extracellulaire (Piper *et al.*, 2002).

Des effets semblables furent observés avec l'analogue chimique DCDPC et des effets plus marqués furent rapportés avec l'A-9-C (Piper & Greenwood, 2003), un composé reconnu pour inhiber $I_{Cl(Ca)}$ beaucoup plus efficacement à des potentiels positifs qu'à des potentiels négatifs (Hogg *et al.*, 1994b). Piper & Greenwood (2003) ont effectivement rapporté qu'en présence d'A-9-C, l'amplitude du courant de queue de $I_{Cl(Ca)}$ à -80 mV en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ était augmentée d'environ 300%, sans stimulation du courant suite au retrait du composé de la solution externe (Piper & Greenwood, 2003). En bref, des composés chimiques différents qui étaient préalablement considérés comme des inhibiteurs relativement sélectifs de $I_{Cl(Ca)}$ présentent également une action stimulatrice sur cette même conductance des myocytes de l'artère pulmonaire de lapin. Par contre, peu d'informations sont disponibles sur les effets dynamiques, incluant la dépendance temporelle et au potentiel membranaire de la stimulation provoquée par le retrait de l'ANF. De plus, il n'est pas connu si ce phénomène est restreint aux myocytes d'artère pulmonaire de lapin ou si $I_{Cl(Ca)}$ des artères coronaires, qui présente certaines différences avec l'artère pulmonaire, est également stimulé par l'ANF.

Stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ induite par l'ANF dans les myocytes coronaires

La présente étude rapporte un phénomène reproductible dans les myocytes d'artères coronaires dialysés avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ similaire à ce qui fut observé dans les cellules musculaires lisses pulmonaires. Toutefois, l'utilisation d'un système de perfusion rapide contrôlé par ordinateur a permis l'étude des dynamiques en temps réel du phénomène de stimulation. Avec un seuil de stimulation par l'ANF entre 1 et

10 μM , une augmentation de ≈ 2 fois de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ fut observée pour les cellules exposées à des concentrations d'ANF allant jusqu'à 1 mM. Notons que l'amplitude de la stimulation est indépendante de la concentration de l'agent utilisé. Cette absence de corrélation entre la concentration d'ANF et l'effet stimulant sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ peut sembler fort surprenante étant donné les résultats présentés à la figure 3.B.1-B. Par contre, la relation apparente entre l'amplitude du courant et la concentration d'ANF décrite à la figure 3.B.1-B reflète en fait les différentes cinétiques de stimulation qui varient selon la concentration d'ANF. Nos résultats montrent à cet égard que l'augmentation relative de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ est indépendante de la concentration d'ANF, mais que le délai pour atteindre l'amplitude maximale augmente en fonction de la concentration d'ANF. De plus, le temps nécessaire pour la récupération du courant de l'état stimulé augmente également en fonction de la concentration d'ANF. D'autre part, nos résultats, tout comme ceux de Piper *et al.* (2002) dans les myocytes d'AP, supportent la notion que le courant stimulé par le lavage d'ANF est généré par les canaux Cl_{Ca} . Tout d'abord, le courant stimulé par l'ANF a un potentiel d'inversion près du E_{Cl} théorique, comme le courant en conditions témoins, confirmant ainsi que les canaux sous-jacents sont perméables au Cl^- . De plus, l'inhibition de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par une forte chélation du Ca^{2+} intracellulaire par le EGTA ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre < 1 nM) a prévenu les effets inhibiteurs et stimulants de l'ANF, démontrant que le courant anionique induit est également sensible au $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Finalement, le courant stimulé par l'ANF était également inhibé par une seconde exposition au composé. Donc, nos résultats ont fourni de fortes évidences que le courant anionique stimulé par l'ANF est une conductance Cl^- activée par le Ca^{2+} , partageant plusieurs propriétés avec $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ en conditions témoins.

La dépendance au potentiel de $I_{Cl(Ca)}$ stimulé par l'ANF

L'amplitude relative de $I_{Cl(Ca)}$ -stimulé par l'ANF était indépendante du potentiel membranaire entre les potentiels testés, soit entre -60 et $+90$ mV. Par contre, le taux de récupération du courant suivant le lavage d'ANF était clairement voltage-dépendant puisque la dépolarisation de la membrane retardait le retour du courant aux valeurs témoins. Une explication possible de ces résultats est que la dissociation de l'ANF est dépendante du potentiel membranaire, la dépolarisation membranaire réduisant le taux de dissociation au(x) site(s) de liaison. Plus de 99.8% des molécules d'ANF seraient ionisées ($pK_a = 4.31$) et donc possèdent une charge nette négative au pH intra- et extracellulaire (pH = 7.2 et 7.4) dans nos conditions expérimentales. Une interaction du composé avec le pore hydrophile du canal ou la portion extracellulaire du vestibule a été suggéré (Greenwood & Large, 1995; Hogg *et al.*, 1994a). Le développement et la récupération de l'inhibition très rapide, étant même à la limite de la résolution de notre système de perfusion rapide (temps d'échange complet < 300 ms) sont en accord avec cette dernière hypothèse. De plus, dans les myocytes de la veine porte de lapin, l'ANF et autres fénamates induisent un « open-state block » de $I_{Cl(Ca)}$ avec une inhibition légèrement supérieure aux potentiels plus positifs qu'aux potentiels plus négatifs que E_{Cl} (Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large, 1995). Notons que nos résultats démontrent également une très légère dépendance de l'inhibition au potentiel membranaire. Piper *et al.* (2002) démontrèrent de plus que l'application intracellulaire d'ANF ($100 \mu M$) était inefficace pour inhiber ou stimuler $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes pulmonaires supportant

encore l'idée que l'ANF module les canaux Cl_{Ca} en accédant à un ou plusieurs sites de liaison principalement localisés près de la bouche externe du pore du canal. Il est également possible que l'ANF interagisse avec des sites de liaison via une interaction électrostatique qui est modulée par le champ électrique transmembranaire ou par l'état cinétique du canal qui dépend de la $[Ca^{2+}]_i$ et du potentiel. D'autre part, étant donné sa nature fortement hydrophobique, nous ne pouvons éliminer la possibilité que l'ANF puisse stimuler les canaux en accédant à des sites de liaison via le feuillet externe de la bicouche lipidique membranaire.

Mécanisme d'action de l'ANF sur les canaux Cl_{Ca}

Puisque la nature moléculaire des canaux Cl_{Ca} natifs est encore inconnue, nous ne pouvons que spéculer sur les mécanismes possibles par lesquels l'ANF agit sur le canal. Bien que nous ne sachions pas si la stimulation par l'ANF est due à un recrutement de canaux silencieux, et/ou une augmentation de la probabilité d'ouverture ou de la conductance unitaire du canal, une augmentation de la probabilité d'ouverture due à un déplacement vers la gauche de l'activation en régime établi est possible. Piper *et al.* (2002) ont démontré que les effets stimulants de l'ANF dans les myocytes pulmonaires étaient abolis par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ de 500 nM à 1 μ M, ce qui augmenterait la disponibilité voltage-dépendante de $I_{Cl(Ca)}$ (Piper *et al.*, 2002).

Il reste à savoir si l'ANF exerce ses actions inhibitrices et stimulatrices en interagissant avec un ou plusieurs sites de liaison. Bien que l'hypothèse d'un seul site de liaison est possible, un mécanisme très compliqué devrait être proposé pour

expliquer nos résultats et ceux de Piper *et al.* (Piper *et al.*, 2002). Nous préconisons plutôt l'hypothèse que l'ANF interagit avec plus d'un site de liaison, chacun avec différentes affinités. Afin de vérifier théoriquement notre hypothèse, nous avons effectué des simulations mathématiques pouvant tenir compte de nos résultats expérimentaux. La difficulté de la modélisation réside dans la complexité du phénomène. De fait, l'amplitude relative de la stimulation par le retrait de l'ANF est indépendante de la concentration du composé, mais cette stimulation peut être décomposée en deux phases. La phase lente augmente en fonction de la concentration en ANF, alors que la phase rapide diminue. Seul le modèle présenté à la figure 3.B.7-G peut reproduire avec une précision satisfaisante les résultats expérimentaux obtenus décrivant ainsi une activation indépendante de la concentration, mais des cinétiques fortement dose-dépendantes. Avec de faibles concentrations d'ANF ($\leq 10 \mu\text{M}$), les molécules devraient se lier au site de haute affinité, probablement à l'intérieur du pore, ce qui induirait un changement conformationnel de la protéine menant à une augmentation de l'activité, bien que cet effet soit principalement masqué par l'obstruction du canal. Peu de canaux pourraient alors transiter vers l'état stimulé O_2 . Au lavage de l'ANF, la plupart des canaux retournent à l'état ouvert normal O_1 alors que certains autres, qui ont adopté la nouvelle conformation favorisant la stimulation, se déplaceraient vers O_2 . La nature lente et transitoire de $I_{\text{Cl(Ca)}}$ pourrait résulter de la dissociation lente de l'ANF ($B_1 \rightarrow O_2$) et de la constante de temps lente qui décrit le retour de l'état ouvert stimulé à l'état ouvert normal ($O_2 \rightarrow O_1$). Avec $100 \mu\text{M}$ ANF, certaines molécules d'ANF commencent à interagir avec le second site d'affinité, de faible affinité, qui mène également à des états inhibés

(B₂) et stimulés (O₃). Les cinétiques très lentes de dissociation d'ANF (B₂ → O₃) et la récupération du courant de l'état stimulé (O₃ → O₁) peuvent expliquer l'apparition d'une phase lente cinétiquement distincte de la stimulation transitoire de I_{Cl(Ca)} après le lavage d'ANF. Ceci devient encore plus évident après le lavage de 1 mM ANF. Le développement de la stimulation est maintenant clairement biphasique avec une phase rapide et une lente, qui sont toutes deux bien décrites par notre modèle. La plus grande contribution de la phase lente avec une plus petite composante rapide est également en accord avec l'existence de deux sites de liaison mutuellement exclusifs.

Malgré que ce soit une hypothèse de travail utile pour décrire l'interaction complexe de l'ANF avec les canaux Cl_{Ca} natifs, le modèle n'offre aucune indication sur les mécanismes moléculaires qui sont impliqués dans l'altération de l'activité du canal par l'ANF. Jusqu'à présent, deux modèles cinétiques ont été proposés pour décrire la dépendance à la [Ca²⁺]_i et au potentiel membranaire des canaux Cl_{Ca} de cellules acinaires (Arreola *et al.*, 1996) et de *Xenopus* (Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000) tel que traité précédemment (*Section 4.A*). Malheureusement, une description détaillée du comportement des canaux Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses vasculaire est encore manquante et est compliquée par la très faible conductance unitaire des canaux (≈ 1-3 pS) (Large & Wang, 1996; Klockner, 1993; Van Renterghem & Lazdunski, 1993; Hirakawa *et al.*, 1999; Piper & Large, 2003) et le fait qu'ils sont régulés par phosphorylation impliquant CaMKII et la CaN (voir *Sections 3.C* et *3.D*), qui sont toutes deux activées par le [Ca²⁺]_i. Bien que des expériences supplémentaires soient nécessaires pour répondre à ces interrogations, une explication possible des effets de l'ANF peut

être que l'inhibiteur promouvoit la liaison du Ca^{2+} et/ou réduise la dissociation du Ca^{2+} , étape voltage-dépendante, menant à une augmentation de la probabilité d'ouverture. D'ailleurs, l'augmentation et la réduction des cinétiques d'activation et de désactivation, respectivement, après le lavage d'ANF sont semblables aux effets d'une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à des niveaux près de la saturation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ dans d'autres types cellulaires (Arreola *et al.*, 1996; Kuruma & Hartzell, 2000).

Importance pharmacologique de nos résultats

La résolution des rôles de Cl_{Ca} dans le muscle lisse vasculaire a été limitée par le manque d'outils pharmacologiques vraiment spécifiques pour le canal. Nos résultats démontrent que l'ANF, le plus puissant inhibiteur de ces canaux dans les myocytes vasculaires (Large & Wang, 1996), provoque également une stimulation complexe de ces canaux dans les cellules musculaires lisses d'artères coronaires de lapin, un effet masqué par son action inhibitrice plus rapide mais peut être révélée par le lavage rapide du composé. Notre étude suggère l'utilisation avec précaution de cet outil pour étudier le rôle de Cl_{Ca} dans la régulation du potentiel membranaire et du tonus vasculaire. Des études ayant pour but d'examiner leur rôle fonctionnel ont démontré que l'ANF réduit le tonus vasculaire induit par des agonistes qui impliquent une élévation soutenue de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. De telles conditions réduisent l'aptitude de l'ANF à inhiber $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ comparativement à son effet sur les STICs (Hogg *et al.*, 1994a; Greenwood & Large, 1995) tel que démontré par la différence d' IC_{50} . Nos données expérimentales et de simulation sont en accord avec la notion que l'efficacité réduite de l'ANF en tant qu'inhibiteur peut être due à une stimulation

partielle de ces canaux en présence du composé. Par conséquent, l'absence d'effets de l'ANF dans les études de contraction avec des préparations multicellulaires ne signifie pas nécessairement que Cl_{Ca} ne participe pas à la détermination du tonus vasculaire.

Section 4.C - Régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes vasculaires de lapin par CaMKII

Des réactions de phosphorylation ne sont pas nécessaires à l'activité des canaux Cl_{Ca} puisque le remplacement de l'ATP de la solution de pipette par son analogue non-hydrolysable, l'AMP-PNP, n'empêche pas l'enregistrement de $I_{Cl(Ca)}$ dans les myocytes d'artères pulmonaires. D'ailleurs, la phosphorylation exerce plutôt une action inhibitrice sur la conductance puisque durant la dialyse de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, le courant diminue d'un façon plus importante en présence d'ATP que d'AMP-PNP. D'autre part, contrairement à $I_{Cl(Ca)}$ de cellules T84 (Arreola *et al.*, 1998), Cl_{Ca} des cellules musculaires lisses de trachée est inhibé par une phosphorylation par CaMKII (Wang & Kotlikoff, 1997a). Nous avons par conséquent étudié la possibilité que CaMKII, une protéine kinase dépendante de la calmoduline et du Ca^{2+} , soit impliquée dans la régulation par phosphorylation de $I_{Cl(Ca)}$.

CaMKII est une protéine kinase multimérique de 300-600 kDa nécessitant la liaison de Ca^{2+} et CaM pour son activation et qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine (Singer *et al.*, 1996). La kinase est composée d'une ou de plusieurs sous-unités différentes (α , β , λ , δ), desquelles λ et δ sont prédominantes dans les muscles lisses. CaMKII est impliquée dans de nombreux rôles d'importance physiologique majeure incluant la modulation de la kinase des chaînes légères de la myosine, la facilitation Ca^{2+} -dépendante des canaux Ca^{2+} et la régulation des courants K^+ de type A. Pour les premières expériences visant à évaluer l'implication de CaMKII dans la régulation de Cl_{Ca} , $I_{Cl(Ca)}$ fut enregistré en utilisant la technique de « patch » perforé et activé par l'influx d'ions Ca^{2+} via les canaux $Ca_{(L)}$ tel que réalisé par d'autres groupes (Lamb *et al.*, 1994; Greenwood & Large, 1996; Yuan, 1997; Lamb *et al.*, 1994). Par

contre, l'utilisation de cette technique comporte une difficulté majeure puisque l'exposition au KN-93, un inhibiteur de CaMKII, réduit le courant Ca^{2+} rapidement. Il est possible que cette diminution de $\text{Ca}_{(L)}$ puisse résulter de l'inhibition de CaMKII qui a une action facilitatrice sur le canal (Singer *et al.*, 1996). Ceci pourrait également expliquer le temps nécessaire au composé pour avoir un effet sur le courant calcique. Puisque cette conductance est essentielle à l'activation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ en utilisant cette technique, toute altération de $\text{Ca}_{(L)}$ est susceptible d'affecter l'activation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. De plus, l'utilisation de caféine pour induire une libération du Ca^{2+} contenu dans le RS afin d'activer $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ n'est pas une alternative adéquate dans ce cas puisque CaMKII affecte également la pompe Ca^{2+} -ATPase du RS, directement et indirectement via la phosphorylation du phospholamban, ce qui permet l'accumulation de Ca^{2+} dans le RS (Singer *et al.*, 1996; Braun & Schulman, 1995; Li *et al.*, 1998). Par conséquent, nous avons réalisé des expériences où le $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ de myocytes artériels et veineux était induit en présence d'une solution de pipette contenant une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ libre fixe et connue. Avec cette technique, le canal est activé directement, indépendamment d'autres mécanismes permettant d'augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tels que la libération spontanée ou induite du Ca^{2+} contenu dans le RS, l'influx Ca^{2+} via $\text{Ca}_{(L)}$ ou l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ fonctionnant en mode inverse. De plus, l'effet de modulateurs des canaux Cl^- peut être étudié outre leurs actions sur les mécanismes de l'homéostasie de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'utilisation de cette technique nous a permis d'observer que l'inhibition de CaMKII, soit par le KN-93 ou un inhibiteur peptidique spécifique (ARIP), augmente l'amplitude du courant basal (au potentiel de repos) et du courant en régime établi lors d'une dépolarisation dans la majorité des cellules musculaires lisses artérielles.

Par contre, il est intéressant de noter que des effets contraires furent enregistrés sur $I_{Cl(Ca)}$ de la veine porte de lapin. Également, $I_{Cl(Ca)}$ fut détecté dans moins de 50% des cellules de VP testées alors que la majorité des myocytes artériels expriment ce courant. Ces résultats suggèrent que les Cl_{Ca} de muscle lisse vasculaire, bien que partageant certaines caractéristiques biophysiques, sont soumis à une régulation différente par CaMKII dans les myocytes de VP comparativement aux cellules musculaires lisses artérielles.

Dans la présente étude, nous avons observé que l'amplitude de $I_{Cl(Ca)}$, induit en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ dans l'artère pulmonaire ou 1 μM $[Ca^{2+}]_i$ dans l'AC, était augmentée par l'exposition du myocyte à l'inhibiteur sélectif de CaMKII, le KN-93. Par contre, le KN-93 n'a eu aucun effet sur $I_{Cl(Ca)}$ en présence de 250 nM $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes d'AP ou de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes d'AC. Une plus faible dépendance au $[Ca^{2+}]_i$ pour la modulation par CaMKII des AC par rapport aux AP peut refléter des différences intrinsèques et intéressantes entre les deux types cellulaires où la balance très fine entre les activités kinases et phosphatases serait déplacée en faveur des phosphatases. De plus, dans la présente étude, le KN-92, un analogue du KN-93 pharmacologiquement inactif sur CaMKII n'a eu aucun effet sur $I_{Cl(Ca)}$. Les effets du KN-93 dans l'AP furent reproduits par l'inclusion d'un peptide inhibiteur hautement spécifique de CaMKII (ARIP) dans la solution de pipette. Les courants induits en présence de 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ 2 minutes après l'activation étaient significativement de plus grande amplitude en présence d'ARIP comparativement aux expériences témoins. De plus, l'application intracellulaire d'une faible concentration de CaMKII autophosphorylée, qui provoque une phosphorylation des

résidus sérine et thréonine des protéines cibles indépendamment de la $[Ca^{2+}]_i$, résulte en une réduction rapide de $I_{Cl(Ca)}$ dans les cellules d'AP. L'effet rapide du peptide inhibiteur ou de l'enzyme active suggère que l'action de l'enzyme est extrêmement rapide, ce qui est appuyé par les travaux de Rokolya & Singer (2000), qui démontrèrent que l'activation de CaMKII par l'histamine dans l'artère carotide de porc atteint un maximum dans un délai inférieur à 10 secondes suivant l'exposition à l'agoniste (Rokolya & Singer, 2000). Il est possible, de fait, que CaMKII et les canaux Cl_{Ca} soient colocalisés, ce qui permettrait une régulation précise des canaux Cl^- par la kinase.

Le KN-93, ARIP et l'autoCaMKII influencent principalement les courants instantanés et soutenus à des potentiels membranaires négatifs. Le KN-93 provoque également un déplacement vers la gauche de la courbe d'activation en régime établi dans les deux types artériels et prolonge aussi le taux de désactivation du courant de queue à des potentiels négatifs dans l'AP. Une tendance semblable, bien que statistiquement non significative, est également apparente dans les myocytes artériels coronaires. Ces résultats suggèrent qu'une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ des myocytes de l'AP et l'AC active les canaux Cl_{Ca} simultanément à la stimulation de CaMKII, ce qui mène à la diminution de l'amplitude du courant bien que le seuil d'un tel effet ne soit apparent qu'à des niveaux plus élevés dans l'AC que l'AP. Le mécanisme par lequel la phosphorylation inhibe l'activation des canaux Cl^- est inconnu mais puisque l'inhibition du courant instantané par le KN-93, l'ARIP et l'autoCaMKII est importante, l'hypothèse selon laquelle la présence de groupements phosphates sur la protéine pourrait soit obstruer le flux ionique ou soit induire un changement

conformationnel est plausible. D'autre part, Wang & Kotlikoff (1997) ont proposé que la phosphorylation par CaMKII induise une inactivation rapide du canal dans les myocytes de trachée (Wang & Kotlikoff, 1997a). Puisque l'inhibition de CaMKII dans la présente étude ralentit le taux de désactivation du canal et promouvoit également les courants à des potentiels négatifs, la phosphorylation par CaMKII pourrait conséquemment accélérer les cinétiques de désactivation du courant de façon analogue à sa désactivation ou son inactivation. L'inhibition de ce processus par le KN-93 stabiliserait donc le canal dans un état de conformation ouvert. La présente étude montre que dans les myocytes d'AP et d'AC, l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ est diminuée par une phosphorylation par CaMKII. L'incapacité du KN-93 à affecter $I_{Cl(Ca)}$ dans une faible proportion de myocytes d'AC et d'AP suggère que le degré d'activation du canal et donc de l'efficacité du KN-93 pourrait être dicté par des régulateurs additionnels à CaMKII tels que des phosphatases. Notamment, une étude de Roeper *et al.* (1997) rapporte que l'inactivation des canaux $K^+ K_V1.4$ est déterminée par une régulation réciproque entre CaMKII et des phosphatases Ca^{2+} -dépendantes (Roeper *et al.*, 1997). Par conséquent, dans les CML, l'activité des canaux Cl_{Ca} pourrait dépendre de la balance entre l'activité des kinases et des phosphatases qui peut varier entre les différents types de cellules musculaires lisses.

En comparaison avec les cellules artérielles, ni l'application de KN-93 ni la perfusion intracellulaire avec l'ARIP n'a pu augmenter $I_{Cl(Ca)}$ des cellules de la VP et ce, peu importe que le courant soit activé en présence de 500 nM ou 1 μM $[Ca^{2+}]_i$. De plus, dans la plupart des cellules de VP, le KN-93 inhibe le courant. Donc, dans les cellules de VP, il semble qu'une phosphorylation par la CaMKII apparaît accentuer

l'activation semblable aux courant Cl^- enregistrés dans les lymphocytes T (Nishimoto *et al.*, 1991) et les colonocytes T84 (Arreola *et al.*, 1998). Il reste toutefois à déterminer si les différents effets du KN-93 entre les types de cellules musculaires lisses étudiés dans cette étude sont dus à la régulation du canal par différentes isoformes de CaMKII ou si CaMKII phosphoryle plutôt d'autres éléments régulateurs non identifiés.

Immunodétection de CaN et CaMKII

La CaMKII et la CaN sont toutes deux exprimées dans le muscle lisse artériel coronaire de lapin tel que révélé par l'immunocytochimie et l'imagerie confocale. L'anticorps polyclonal que nous avons utilisé contre CaMKII ne permet pas de distinguer entre les différentes isoformes isolées jusqu'à présent (Singer *et al.*, 1996). Les isoformes δ et γ sont rapportées comme étant prédominantes dans le muscle lisse (Zhou & Ikebe, 1994; Singer *et al.*, 1996). De même, l'anticorps monoclonal de souris contre la CaN a été généré contre un épitope de la CaNA sans discrimination entre deux isoformes de la phosphatase [CaNA α et β , (Klee *et al.*, 1998; Rusnak & Mertz, 2000)]. Une particularité intéressante et nouvelle de la localisation cellulaire de ces protéines est que dans les cellules exposées à une solution externe normale, les deux enzymes présentent une distribution relativement uniforme dans le cytosol avec certains amoncellements de CaMKII près de la membrane. De plus, alors qu'un marquage intense de CaMKII est apparent dans le noyau, l'immunodétection de CaN est plutôt faible dans cette organelle. Par contre, un marquage plus intense des deux enzymes près de la membrane fut observé dans des myocytes exposés à un ionophore

Ca^{2+} pour augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Ces résultats montrent que CaMKII et CaN se déplacent vers la membrane quand la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ est augmentée et peut donc potentiellement influencer l'activité de canaux, transporteurs et autres protéines impliqués dans la régulation par la modulation de leur état de phosphorylation. Un double marquage a démontré un haut degré de colocalisation membranaire des deux protéines. De plus, le marquage de la CaN fut plus apparent au niveau du noyau dans les expériences en simple marquage. Cette observation est en accord avec la translocation de cette phosphatase et de CaMKII décrite et caractérisée dans d'autres types cellulaires (Chantler, 1985; Klee *et al.*, 1998; Shen & Meyer, 1999; Rusnak & Mertz, 2000). Il est tentant de suggérer que la régulation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par CaMKII et la CaN puisse être exercée par une interaction ciblée à la membrane où une élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pourrait favoriser la juxtaposition du canal et de deux enzymes régulatrices ayant des effets opposés. Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec précaution étant donné la faible résolution relative de l'imagerie confocale due à l'utilisation de longueur d'ondes dans le spectre de la lumière visible (Stricker & Whitaker, 1999) et possiblement l'effet d'amplification du signal due à l'amoncellement d'anticorps secondaires. Il est néanmoins possible que le ciblage à la membrane de la CaN et de CaMKII amplifie leur potentiel effecteur sur l'activité des Cl_{Ca} , le potentiel membranaire et conséquemment, le tonus vasculaire durant la transduction du signal.

Section 4.D - Stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes artériels par la CaN*CaN stimule $I_{Cl(Ca)}$*

Puisqu'il fut démontré que CaMKII agissait comme un inhibiteur de $I_{Cl(Ca)}$ dans les cellules musculaires lisses artérielles (Section 3.C) et de trachée (Wang & Kotlikoff, 1997a), le canal est probablement modulé par, à tout le moins, une phosphatase d'une manière opposée à CaMKII. Des travaux ont démontré qu'une déphosphorylation par la CaN régulaient plusieurs canaux intracellulaires comme les récepteurs à la ryanodine (Park *et al.*, 1999) et à l' IP_3 (Cameron *et al.*, 1995) et des canaux à la membrane plasmique incluant les canaux calciques de type N (Zhu & Yakel, 1997) et les récepteurs NMDA couplés à un canal Ca^{2+} des membranes post-synaptiques (Ghetti & Heinemann, 2000), les canaux Cl^- dépendants de l'insuline (Marunaka *et al.*, 1998), les canaux $Ca_{(L)}$ (Schuhmann *et al.*, 1997) et K_{ATP} (Wilson *et al.*, 2000) des cellules musculaires lisses. De plus, des expériences immunocytochimiques (Section 3.C, figure 3.C.10) ont démontré une relocalisation de la CaN vers la membrane plasmique de myocytes coronaires suite à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ à 500 nM, suggérant ainsi que des protéines membranaires telles que les canaux ioniques, dont Cl_{Ca} , puissent être des substrats de l'enzyme. Les résultats de la présente étude (Section 3.D) suggèrent également que $I_{Cl(Ca)}$ de cellules musculaires lisses d'artères coronaires et pulmonaires est augmenté par la CaN en présence de $[Ca^{2+}]_i$ modérément élevée.

La densité de courant de $I_{Cl(Ca)}$ induit dans des myocytes dialysés avec 350 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$ en présence de CsA est apparue significativement inférieure à celle de cellules non traitées avec CsA. Des concentrations de l'ordre du micromolaire furent

utilisées dans plusieurs études pour étudier l'effet potentiel de la CaN sur plusieurs fonctions cellulaires. Schuhmann *et al.* (1997) ont utilisé 1 $\mu\text{g/ml}$ CsA (0.83 μM) pour étudier le potentiel déphosphorylant de CaN sur les courants $\text{Ca}_{\text{(L)}}$ enregistrés de cellules musculaires lisses vasculaires (Schuhmann *et al.*, 1997). Marunaka *et al.* (1998) ont utilisé 1 μM CsA pour étudier le rôle de CaN dans certains effets de l'insuline sur des canaux Cl^- de l'épithélium rénal (Marunaka *et al.*, 1998). Wilson *et al.* (2000) ont utilisé une concentration de CsA identique à celle de notre étude pour les effets de CaN sur K_{ATP} enregistrés de cellules musculaires lisses aortiques de rat (Wilson *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'efficacité très élevée du CaN-AF sur $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$ dans nos expériences était quelque peu inattendue. Une explication possible est que les deux isoformes de la CaNA, α et β , qui sont exprimées dans les cellules musculaires lisses présentent différentes valeurs de K_m envers le peptide auto-inhibiteur de CaN comme substrat (Perrino *et al.*, 2002) ce qui pourrait influencer l'efficacité de CaN-AF à inhiber $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$. L'expression supérieure ainsi que la spécificité de l'isoforme α , qui présente une plus grande sensibilité au CaN-AF, sur $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$ peut effectivement résulter en une plus grande efficacité du peptide. De plus, l'application externe de CsA atténue significativement $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$ de myocytes en condition témoin sans produire d'effet sur $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$ induit dans des myocytes dialysés avec CaN-AF. Ce résultat supporte l'hypothèse que CsA et CaN-AF, qui sont structuralement non reliés, interagissent tous deux avec la même protéine et que les effets observés sont la résultante de l'inhibition spécifique de l'enzyme.

La présente étude indique que la modulation de $\text{I}_{\text{Cl(Ca)}}$ par la CaN est complexe et varie selon la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de façon semblable à celle de l'effet de CaMKII

rapporté à la *Section 3.C*. Avec 350 nM $[Ca^{2+}]_i$, l'impact de la CaN dans la régulation de la conductance du canal augmente avec la dépolarisation membranaire. Il est intéressant de noter que la situation inverse fut observée lorsque les cellules étaient dialysées avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$. Nous n'avons pu déterminer à partir de nos résultats si l'état de phosphorylation du canal revêtait une influence quelconque sur la perméation. Toutefois, la CaN semble moduler les mécanismes de « gating » puisque la CsA provoque des changements significatifs dans les cinétiques de courant dépendant du temps durant la dépolarisation et la repolarisation. Ces changements étaient aussi qualitativement opposés à ceux induits par CaMKII (*Section 3.B*). Il apparaît donc sur la base de nos résultats que la déphosphorylation médiée par la CaN sensibilise le canal au potentiel indépendamment de la $[Ca^{2+}]_i$ (Arreola *et al.*, 1996). En accord avec l'hypothèse selon laquelle la CaN induit un déplacement vers des potentiels négatifs de la courbe d'activation de $I_{Cl(Ca)}$ en régime établi, la proportion de l'inhibition de $g_{Cl(Ca)}$ par la CsA augmente en fonction du potentiel membranaire en présence de 350 nM $[Ca^{2+}]_i$ (figure 3.D.3-Ad). D'un autre côté, avec 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, le déclin de la proportion d'inhibition de $g_{Cl(Ca)}$ en fonction du voltage par la CsA (figure 3.D.Ad) pourrait être relié au fait que la courbe d'activation est déplacée davantage vers la gauche par le Ca^{2+} . Dans ce cas, l'impact de la CaN devrait apparemment décroître en fonction du voltage étant donné que les sauts de potentiel testés portent dans le haut de la courbe d'activation en régime établi alors qu'en présence de 350 nM, la gamme de potentiels examinés repose sur la portion inférieure de la courbe d'activation de $I_{Cl(Ca)}$. En plus du déplacement de la courbe d'activation, nous ne pouvons rejeter la possibilité que la déphosphorylation peut

également recruter des canaux auparavant silencieux, résultat d'une phosphorylation. Finalement, notre analyse a également révélé que la déphosphorylation par la CaN du canal ou d'une protéine régulatrice augmente la sensibilité du canal au Ca^{2+} intracellulaire puisque la CsA augmente la valeur de l'activation semi-maximale par le Ca^{2+} de 152 nM à +50 mV. Ceci n'est pas surprenant compte tenu de la dépendance au voltage et au Ca^{2+} de ces canaux dans le muscle lisse vasculaire (Large & Wang, 1996; Greenwood *et al.*, 2001) et d'autres types cellulaires (Arreola *et al.*, 1996; Voets *et al.*, 1997; Callamaras & Parker, 2000; Kuruma & Hartzell, 2000). Soit la déphosphorylation par la CaN influence la liaison voltage-dépendante du Ca^{2+} (Arreola *et al.*, 1996) ou alors la désactivation du canal, (Kuruma & Hartzell, 2000) ce qui requiert également des analyses quantitatives supplémentaires.

Il est, de plus, fort intéressant de noter une modulation spécifique de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ qui dépend de l'isoforme de la CaN. La dialyse de CaNA α dans le cytoplasme de myocytes d'artères pulmonaires produit des effets cohérents avec ceux obtenus par l'inhibition de l'enzyme endogène de cellules d'artères coronaires par la CsA et un peptide inhibiteur tant sur l'amplitude que sur les cinétiques du courant. D'autre part, malgré que la CaNA β soit également exprimée dans le muscle vasculaire pulmonaire et que les deux isoformes partagent 81% d'homologie au niveau de la séquence en acides aminés, l'inclusion d'une forme constitutivement active de l'enzyme dans la pipette n'induit aucun effet significatif sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$. Des expériences immunocytochimiques révélèrent de plus que, suivant une augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_i$ à 500 nM, seulement la CaNA α endogène et non la CaNA β est transportée vers la membrane plasmique du myocyte. Des études antérieures ont rapporté que les deux

isoformes présentent des activités catalytiques et des affinités différentes pour les substrats différents *in vitro* (Perrino *et al.*, 2002). Des approches transgéniques ont révélé des fonctions spécifiques aux différentes isoformes. Par exemple, la CaNA β est requise pour la prolifération des lymphocytes T de même que l'hypertrophie cardiaque (Bueno *et al.*, 2002a; Bueno *et al.*, 2002b) et une souris transgénique où l'expression de la CaNA α est éliminée ($-/-$) présente une hyperphosphorylation des protéines tau dans le cerveau et des propriétés potentiatrices post-synaptiques altérées dans l'hippocampe (Kayyali *et al.*, 1997; Zhuo *et al.*, 1999). Mais la présente étude est le premier rapport d'une action différentielle des isoformes de la CaN sur des canaux ioniques natifs. De plus, ces données suggèrent que le ratio entre les deux isoformes est déterminant pour le statut de phosphorylation des substrats de la CaN qui sont sélectivement déphosphorylés par l'une des isoformes de la CaNA. Ceci suggère donc que la régulation de $I_{Cl(Ca)}$ par la CaN peut être finement régulée par l'altération de l'expression de la CaN et sa localisation cellulaire.

CaMKII et la CaN exercent des effets régulateurs opposés sur $I_{Cl(Ca)}$.

Notre étude démontre clairement les effets opposés de CaMKII et la CaN sur $I_{Cl(Ca)}$ dans les cellules musculaires lisses artérielles. L'inhibition de CaMKII par le KN-93 accélère les cinétiques d'activation et retarde la désactivation de $I_{Cl(Ca)}$ des myocytes pulmonaires alors que l'inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ de myocytes coronaires par CsA est associée à un ralentissement des cinétiques d'activation. En se basant sur le modèle cinétique de Kuruma & Hartzell (2000) traité à la Section 4.A, on peut émettre l'hypothèse qu'une phosphorylation par CaMKII limite la liaison ou

augmente la dissociation du Ca^{2+} au canal et que cet effet soit renversé par la phosphatase. De plus, la dépendance au Ca^{2+} des effets du KN-93 et CsA était fort différente dans l'artère coronaire. Le KN-93 augmente $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ seulement lorsque le canal est stimulé par $1 \mu\text{M } [\text{Ca}^{2+}]_i$, alors que l'inhibition de la CaN par CsA réduit significativement ce courant avec $[\text{Ca}^{2+}]_i \leq 500 \text{ nM}$.

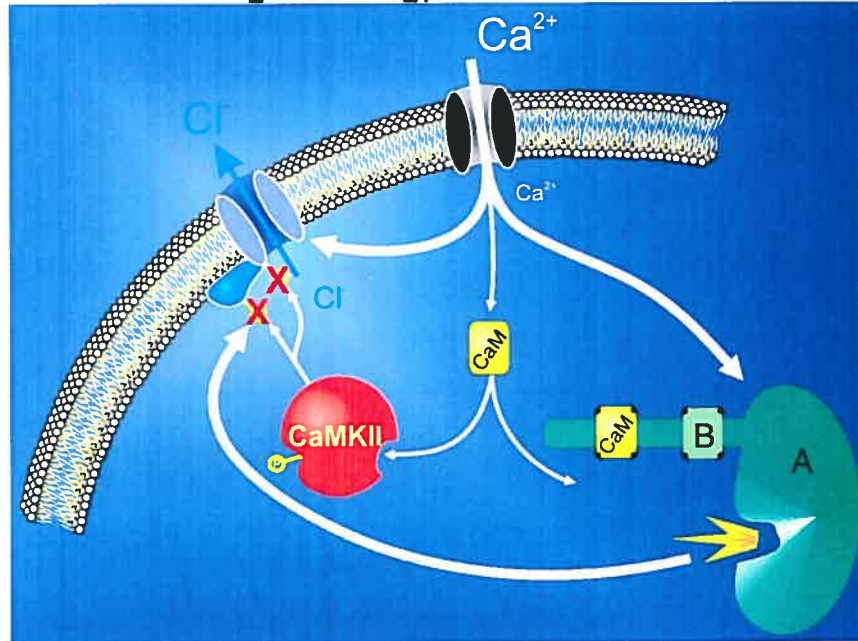
Une explication potentielle de nos résultats est que la déphosphorylation de CaMKII autophosphorylée est médiée par la CaN. Toutefois, des études biochimiques suggèrent que la déphosphorylation de CaMKII est plutôt médiée par PP1 et PP2A (Strack *et al.*, 1997a) ou une nouvelle phosphatase des CaMK (Ishida *et al.*, 1998). Une explication alternative peut être que la CaN est plus sensible à la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que CaMKII. Tout d'abord, la CaN est sujette à une régulation par un double mécanisme : 1) activation directe de CaN par une liaison de haute affinité du Ca^{2+} à la sous-unité CaNB qui mène à une modeste, mais tout de même significative augmentation du V_{max} (≈ 2 fois), et 2) stimulation par la liaison de Ca^{2+} /CaM augmente V_{max} par plus de vingt fois (Klee *et al.*, 1998). De plus, à des niveaux saturants de Ca^{2+} , le K_d pour la liaison de la CaM à la CaN est de l'ordre de 0.1 à 1 nM alors que pour CaMKII le K_d oscille entre 20 à 100 nM. Dans le muscle lisse vasculaire, la dépendance au Ca^{2+} *in situ* pour générer CaMKII autophosphorylée est également hautement coopérative (coefficient de Hill =3) avec une EC_{50} près de 700 nM (Singer *et al.*, 1996). Puisque la CaN est plus sensible au Ca^{2+} que CaMKII, il serait attendu que la régulation de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ à une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intermédiaire (350-500 nM) soit dictée principalement par la CaN en augmentant l'activité d' $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par la déphosphorylation du canal ou d'une protéine régulatrice. En d'autres termes, dans le

muscle lisse artériel, avec 350 ou 500 nM $[Ca^{2+}]_i$, l'habileté de CaMKII à diminuer $I_{Cl(Ca)}$ devrait être inférieure à la déphosphorylation plus efficace exercée par CaN. Par contre, lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ est supérieure, les canaux Cl_{Ca} sont probablement sujets à une régulation plus balancée par les deux enzymes et même où l'action de la kinase est plus importante (figure 4.D.1). Cet équilibre peut être influencé par la composition (différentes sous-unités) de CaMKII ainsi que par d'autres protéines régulatrices. D'ailleurs, l'expression distincte de protéines régulatrices pourrait expliquer la différence observée quant à la $[Ca^{2+}]_i$ nécessaire pour enregistrer un effet du KN-93 entre les myocytes d'AP et d'AC.

L'activation directe par le Ca^{2+} et l'influence d'enzymes Ca^{2+} -dépendantes.

Une question importante qui demeure non résolue, dû au manque d'informations sur l'identité moléculaire de ces canaux dans les cellules musculaires lisses vasculaires natives ou d'autres cellules excitables, est à savoir si les canaux Cl_{Ca} sont directement activés par le Ca^{2+} ou requièrent une phosphorylation Ca^{2+} -dépendante pour leur activation tel que démontré pour les canaux Cl^- de certaines cellules épithéliales (Fuller *et al.*, 1994). Nous avons démontré précédemment que l'introduction de CaMKII constitutivement active dans le cytoplasme des myocytes d'artère pulmonaire atténue l'activation de $I_{Cl(Ca)}$. Également, l'inclusion de CaN active dans le cytoplasme de cellules pulmonaires dialysées avec une solution sans Ca^{2+} n'a eu aucun effet. De plus, des études récentes en patch « inside-out » réalisées sur des cellules musculaires lisses d'artère aortique de souris et de lapin (Hirakawa *et al.*, 1999) et pulmonaire de lapin (Piper & Large, 2003) démontrèrent que les

$[Ca^{2+}]_i$ faible



$[Ca^{2+}]_i$ élevée

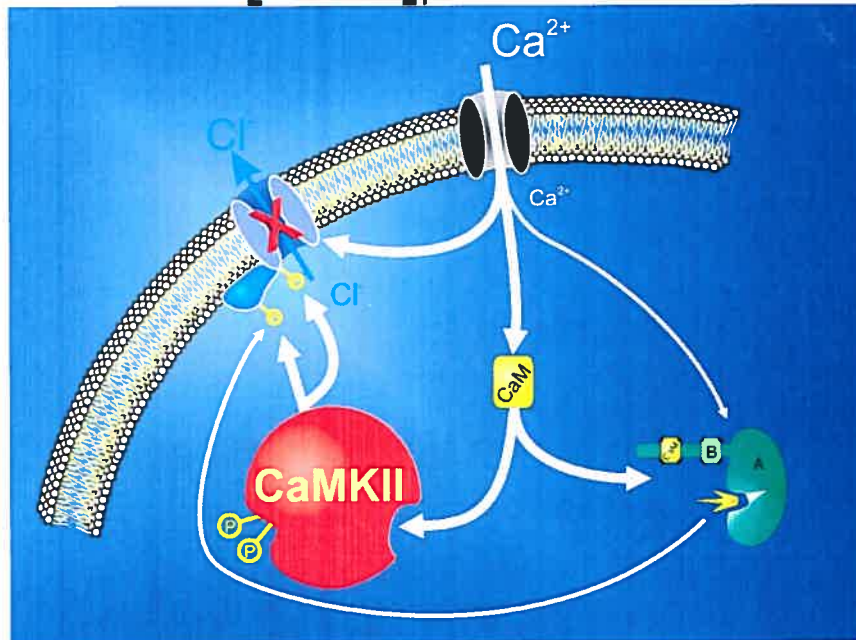


Figure 4.D.1 Schéma de la régulation de $I_{Cl(Ca)}$ des cellules musculaires lisses artérielles par les enzymes activées par le niveau de Ca^{2+} intracellulaire.

A : CaNA; B : CaNB; Ca^{2+} : ions calcium; CaM : Calmoduline; CaMKII; Protéine Kinase Dépendante de la Calmoduline II; Cl^{-} : Ions chlorures; P : Groupement phosphate.

courants Cl^- unitaires peuvent être activés par le Ca^{2+} appliqué directement du côté intracellulaire de la membrane. Il a été démontré dans les myocytes pulmonaires que le Ca^{2+} modifiait le « gating » de même que la perméabilité anionique d'une manière qui varie avec la concentration; avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$, trois sous-conductances distinctes de 1.2, 1.8 et 3.5 pS démontrant un comportement voltage-indépendant purent être résolues (Piper & Large, 2003). Dans cette étude, l' EC_{50} pour l'activation du canal par le Ca^{2+} se situe entre 8 nM et 250 nM. Ces valeurs sont nettement inférieures à celle déterminée dans la présente étude (363 nM) pour les myocytes coronaires et dans les myocytes de la veine porte de rat (365 nM; (Pacaud *et al.*, 1992)). Cette différence peut refléter l'état de phosphorylation minimal du canal pour des enregistrements en patch excisé. Bien qu'il peut être tentant de conclure que le Ca^{2+} active directement les canaux Cl_{Ca} et que leur activité est seulement modulée par CaMKII et CaN, nous devons être prudents dans l'extrapolation de ces résultats. Des observations récentes suggèrent que la facilitation Ca^{2+} -dépendante et l'inactivation des canaux Ca^{2+} de type P/Q sont conférées par la liaison du Ca^{2+} à la CaM qui se lie à un motif « IQ » sur la portion carboxy-terminale de la sous-unité α_{1A} (DeMaria *et al.*, 2001). L'activation par le Ca^{2+} local de canaux K^+ à petite conductance (Xia *et al.*, 1998) et l'inactivation Ca^{2+} -dépendante des canaux Ca_{L} (sous-unité α_{1C} ; (Pitt *et al.*, 2001)) par la calmoduline ont également été documentées. Finalement, l'augmentation du courant K^+ lent à rectification retardée des myocytes cardiaques, I_{Ks} , par une stimulation β -adrénergique requiert le ciblage de la kinase dépendante du 3'-5' monophosphate et de PP1 à la sous-unité régulatrice du canal hKCNQ1 via la protéine yotiao (Marx, 2002). Il demeure donc possible que le « gating » de canaux

Cl^- activés par le Ca^{2+} de myocytes vasculaires soit dicté par la liaison du Ca^{2+} à une protéine et/ou une enzyme qui peut être associée de façon permanente avec l'une des sous-unités du canal ou recrutée durant l'élévation de $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Importance physiologique

La déphosphorylation par la CaN de Cl_{Ca} ou d'une sous-unité régulatrice pourrait jouer un rôle important dans la régulation du potentiel membranaire et du tonus vasculaire. À des potentiels membranaires physiologiques, la CsA réduit la conductance de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ à -50 mV de 44% dans les cellules d'AC dialysées avec 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Puisque la résistance d'entrée de ces cellules musculaires lisses est élevée (Leblanc *et al.*, 1994), même un faible changement de la conductance Cl^- peut avoir un impact important sur le potentiel membranaire de repos. La régulation différentielle Ca^{2+} -dépendante de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ par CaMKII et la CaN pourrait alors permettre une fine régulation de la dépolarisation membranaire induite par l'occupation d'agonistes constricteurs à leurs récepteurs. Avec une faible stimulation menant à une élévation modeste de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, un rôle plus important de CaN pourrait induire une activation soutenue de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ et la dépolarisation membranaire. À une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ supérieure, l'augmentation progressive de l'activité de CaMKII par $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ pourrait augmenter la phosphorylation, menant à la diminution de $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ et conduisant ainsi à la réduction de l'entrée de Ca^{2+} soutenue à travers des canaux Ca_{L} et essentiellement à une diminution du tonus vasculaire. Cette hypothèse est en accord avec les résultats récents obtenus au laboratoire démontrant que la relaxation sensible à l'ANF d'artères mésentériques de résistance de lapin pré-contractées avec la

phényléphrine (agoniste α_1 -adrénergique) est inversement reliée à la concentration de cet agoniste (Remillard *et al.*, 2000).

Chapitre 5

<i>Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{Cl(Ca)}$.....</i>	216
--	-----

<i>Régulation par phosphorylation de $I_{Cl(Ca)}$ dans le muscle lisse vasculaire.....</i>	217
---	-----

La présente étude avait comme objectif principal de caractériser les courants Cl^- activés par le Ca^{2+} ($I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$) de cellules musculaires lisses fraîchement isolées de trois lits vasculaires, soit la veine porte et les artères coronaires et pulmonaires de lapin. La conductance fut donc étudiée sur les plans biophysique et pharmacologique, mais leur régulation par des enzymes activées par le Ca^{2+} fut également examinée. Puisque $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ est activé par la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, plusieurs techniques ont été utilisées afin d'augmenter la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'une de ces techniques, le « Ca^{2+} -clamp », a permis d'étudier $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ avec une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fixe et connue, limitant ainsi les effets d'une variation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Étude dynamique des effets de l'acide niflumique sur $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$

L'interaction stimulante de l'acide niflumique avec $I_{\text{Cl}(\text{Ca})}$ rapportée dans les myocytes de l'artère pulmonaire (Piper *et al.*, 2002) est également présente dans les cellules musculaires de l'artère coronaire de lapin en présence de 500 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Cette action stimulante est masquée par l'effet inhibiteur de l'ANF sur le canal. Cette étude a permis de réaliser une analyse quantitative de l'amplitude et du décours temporel de la stimulation suivant le lavage de l'ANF pour des concentrations variant de 1 μM à 1 mM et d'évaluer la façon dont ces paramètres sont modifiés par le potentiel membranaire. Les cinétiques complexes de stimulation à différentes concentrations d'ANF peuvent être simulées par un modèle présentant au moins deux sites de liaison, un de haute affinité pour l'ANF ($K_i < 30 \mu\text{M}$) et un de faible affinité ($K_i = 1.25 \text{ mM}$). Toutefois, l'identité du gène codant pour Cl_{Ca} étant encore inconnue,

il nous est impossible pour l'instant d'affirmer que l'effet stimulant de l'ANF n'implique aucunement une protéine régulatrice du canal.

Régulation par phosphorylation de $I_{Cl(Ca)}$ dans le muscle lisse vasculaire

La présente étude démontre pour la première fois que $I_{Cl(Ca)}$, induit en présence d'une $[Ca^{2+}]_i$ stable, des cellules musculaires lisses de la veine porte et des artères coronaires et pulmonaires de lapin ont des caractéristiques biophysiques semblables. Toutefois, l'expression fonctionnelle du canal de même que sa régulation par CaMKII est distincte entre le muscle lisse artériel et veineux. Dans le muscle artériel, l'activation de CaMKII peut être impliquée dans une boucle de rétroaction négative, spécialement à des $[Ca^{2+}]_i$ élevées, afin de réduire l'influence dépolarisante de $I_{Cl(Ca)}$ sur le potentiel membranaire et le tonus vasculaire durant la stimulation par des agents vasoconstricteurs. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente affirmant que la vasodilatation sensible à l'acide niflumique d'artérioles mésentériques de lapin préssurisées et précontractées par la phényléphrine est plus importante à des concentrations faibles ou intermédiaires (0.1 à 1 μ M) de l'agoniste α_1 -adrénergique (Remillard *et al.*, 2000). Par contre, certains types de cellules musculaires lisses, telle que la veine porte de lapin, présentent des potentiels d'action spontanés (Holman *et al.*, 1968; Hume & Leblanc, 1989). Dans ce cas, l'activation de $I_{Cl(Ca)}$ par CaMKII via la libération de Ca^{2+} spontanée du RS ou durant la stimulation sympathique peut promouvoir la décharge de potentiels d'action par la stimulation de STICs (Hogg *et al.*, 1993) auxquels on assigne un rôle important dans les contractions rythmiques de la trachée (Janssen & Sims, 1994) ou dans la modulation

de vagues de potentiels d'action (Pacaud *et al.*, 1989). En accord avec ceci, une inhibition de $I_{Cl(Ca)}$ par des inhibiteurs de CaMKII fut observée dans certaines cellules de la veine porte.

Par ailleurs, aucune étude antérieure n'avait jusqu'à présent démontré l'action de la CaN sur des canaux Cl_{Ca} . De plus, cette influence stimulatrice de la CaN est fortement dépendante de l'isoforme, la CaNA β n'ayant aucun effet sur la conductance anionique contrairement à l'isoforme α . Par conséquent, la CaNA α pourrait être impliquée dans un mécanisme de rétroaction positive permettant de maintenir une contraction soutenue des myocytes artériels.

En conclusion, la régulation de l'activité des canaux Cl_{Ca} des myocytes vasculaires est très complexe, impliquant à la fois une activation directe par le Ca^{2+} et des enzymes activées par le Ca^{2+} ayant des actions opposées. Par conséquent, non seulement la $[Ca^{2+}]_i$ est primordiale pour l'activité du canal *per se*, mais également pour l'état de phosphorylation dans lequel il se trouve.

Sources documentaires

Abdel-Ghany, M., Cheng, H. C., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (2001). The breast cancer beta 4 integrin and endothelial human CLCA2 mediate lung metastasis. *J.Biol.Chem.* 276, 25438-25446.

Abdel-Ghany, M., Cheng, H. C., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (2002). Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. *J.Biol.Chem.* 277, 34391-34400.

Accardi, A., Kolmakova-Partensky, L., Williams, C., & Miller, C. (2004). Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *J Gen.Physiol* 123, 109-119.

Accardi, A. & Miller, C. (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *Nature* 427, 803-807.

Accardi, A. & Pusch, M. (2003). Conformational changes in the pore of CLC-0. *J Gen.Physiol* 122, 277-293.

Accili, E. A. & DiFrancesco, D. (1996). Inhibition of the hyperpolarization-activated current (if) of rabbit SA node myocytes by niflumic acid. *Pflugers Arch.* 431, 757-762.

Adachi, S., Uchida, S., Ito, H., Hata, M., Hiroe, M., Marumo, F., & Sasaki, S. (1994). Two isoforms of a chloride channel predominantly expressed in thick ascending limb of Henle's loop and collecting ducts of rat kidney. *J.Biol.Chem.* 269, 17677-17683.

Agnel, M., Verjat, T., & Culouscou, J. M. (1999). Identification of three novel members of the calcium-dependent chloride channel (CaCC) family predominantly expressed in the digestive tract and trachea. *FEBS Lett.* 455, 295-301.

Aickin, C. C. & Brading, A. F. (1982). Measurement of intracellular chloride in guinea-pig vas deferens by ion analysis, ³⁶chloride efflux and micro-electrodes. *J.Physiol* 326, 139-154.

Akabas, M. H. (2000). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J.Biol.Chem.* 275, 3729-3732.

Allen, B. G. & Walsh, M. P. (1994). The biochemical basis of the regulation of smooth-muscle contraction. *Trends Biochem.Sci.* 19, 362-368.

Amedee, T., Benham, C. D., Bolton, T. B., Byrne, N. G., & Large, W. A. (1990). Potassium, chloride and non-selective cation conductances opened by noradrenaline in rabbit ear artery cells. *J.Physiol* 423, 551-568.

Anderson, K. A., Means, R. L., Huang, Q. H., Kemp, B. E., Goldstein, E. G., Selbert, M. A., Edelman, A. M., Freneau, R. T., & Means, A. R. (1998). Components of a calmodulin-dependent protein kinase cascade. Molecular cloning, functional characterization and cellular localization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase beta. *J.Biol.Chem.* 273, 31880-31889.

Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E., & Welsh, M. J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.

Antoni, F. A., Smith, S. M., Simpson, J., Rosie, R., Fink, G., & Paterson, J. M. (1998). Calcium control of adenylyl cyclase: the calcineurin connection. *Adv.Second Messenger Phosphoprotein Res.* 32, 153-172.

Arreola, J., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (1996). Activation of calcium-dependent chloride channels in rat parotid acinar cells. *J.Gen.Physiol* 108, 35-47.

Arreola, J., Melvin, J. E., & Begenisich, T. (1998). Differences in regulation of Ca(2+)-activated Cl⁻ channels in colonic and parotid secretory cells. *Am.J Physiol* 274, C161-C166.

Ashcroft, F. (2000). *Ion channels and disease: channelopathies*, 1st ed. Academic Press.

Ashley, R. H. (2003). Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review). *Mol.Membr.Biol.* 20, 1-11.

Avdonin, P. V., Cottet-Maire, F., Afanasjeva, G. V., Loktionova, S. A., Lhote, P., & Ruegg, U. T. (1999). Cyclosporine A up-regulates angiotensin II receptors and calcium responses in human vascular smooth muscle cells. *Kidney Int.* 55, 2407-2414.

Bakall, B., Marknell, T., Ingvast, S., Koisti, M. J., Sandgren, O., Li, W., Bergen, A. A., Andreasson, S., Rosenberg, T., Petrukhin, K., & Wadelius, C. (1999). The mutation spectrum of the bestrophin protein--functional implications. *Hum.Genet.* 104, 383-389.

Bakall, B., Marmorstein, L. Y., Hoppe, G., Peachey, N. S., Wadelius, C., & Marmorstein, A. D. (2003). Expression and localization of bestrophin during normal mouse development. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 44, 3622-3628.

Bakhramov, A., Hartley, S. A., Salter, K. J., & Kozlowski, R. Z. (1996). Contractile agonists preferentially activate CL- over K⁺ currents in arterial myocytes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 227, 168-175.

Baron, A., Pacaud, P., Loirand, G., Mironneau, C., & Mironneau, J. (1991). Pharmacological block of Ca(2+)-activated Cl⁻ current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.* 419, 553-558.

Bayer, K. U., De Koninck, P., Leonard, A. S., Hell, J. W., & Schulman, H. (2001). Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 411, 801-805.

Bayer, K. U., Harbers, K., & Schulman, H. (1998). alphaKAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle. *EMBO J.* 17, 5598-5605.

Bayer, K. U. & Schulman, H. (2001). Regulation of signal transduction by protein targeting: the case for CaMKII. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 289, 917-923.

Ben Ari, Y., Khazipov, R., Leinekugel, X., Caillard, O., & Gaiarsa, J. L. (1997). GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois'. *Trends Neurosci.* 20, 523-529.

Benham, C. D., Bolton, T. B., Byrne, N. G., & Large, W. A. (1987). Action of externally applied adenosine triphosphate on single smooth muscle cells dispersed from rabbit ear artery. *J.Physiol* 387, 473-488.

Bennecib, M., Gong, C. X., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2001). Inhibition of PP-2A upregulates CaMKII in rat forebrain and induces hyperphosphorylation of tau at Ser 262/356. *FEBS Lett.* 490, 15-22.

Bhalla, U. S. & Iyengar, R. (1999). Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283, 381-387.

Birkenhager, R., Otto, E., Schurmann, M. J., Vollmer, M., Ruf, E. M., Maier-Lutz, I., Beekmann, F., Fekete, A., Omran, H., Feldmann, D., Milford, D. V., Jeck, N., Konrad, M., Landau, D., Knoers, N. V., Antignac, C., Sudbrak, R., Kispert, A., & Hildebrandt, F. (2001). Mutation of BSND causes Bartter syndrome with sensorineural deafness and kidney failure. *Nat.Genet.* 29, 310-314.

Blaustein, M. P. (1993). Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness. *Am.J.Physiol* 264, C1367-C1387.

Blitzer, R. D., Connor, J. H., Brown, G. P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., & Landau, E. M. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280, 1940-1942.

Bolton, T. B., Prestwich, S. A., Zholos, A. V., & Gordienko, D. V. (1999). Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. *Annu.Rev.Physiol* 61, 85-115.

Bosl, M. R., Stein, V., Hubner, C., Zdebik, A. A., Jordt, S. E., Mukhopadhyay, A. K., Davidoff, M. S., Holstein, A. F., & Jentsch, T. J. (2001). Male germ cells and photoreceptors, both dependent on close cell-cell interactions, degenerate upon CIC-2 Cl^{-} channel disruption. *EMBO J.* 20, 1289-1299.

Bradbury, N. A. (1999). Intracellular CFTR: localization and function. *Physiol Rev.* 79, S175-S191.

Braun, A. P. & Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu.Rev.Physiol* 57, 417-445.

Brenner, R., Perez, G. J., Bonev, A. D., Eckman, D. M., Kosek, J. C., Wiler, S. W., Patterson, A. J., Nelson, M. T., & Aldrich, R. W. (2000). Vasoregulation by the $\beta 1$ subunit of the calcium-activated potassium channel. *Nature* 407, 870-876.

Britton, F. C., Hatton, W. J., Rossow, C. F., Duan, D., Hume, J. R., & Horowitz, B. (2000). Molecular distribution of volume-regulated chloride channels (CIC-2

and ClC-3) in cardiac tissues. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279, H2225-H2233.

Britton, F. C., Ohya, S., Horowitz, B., & Greenwood, I. A. (2002). Comparison of the properties of CLCA1 generated currents and I(Cl(Ca)) in murine portal vein smooth muscle cells. *J.Physiol* 539, 107-117.

Brocke, L., Chiang, L. W., Wagner, P. D., & Schulman, H. (1999). Functional implications of the subunit composition of neuronal CaM kinase II. *J.Biol.Chem.* 274, 22713-22722.

Bueno, O. F., van Rooij, E., Molkentin, J. D., Doevendans, P. A., & De Windt, L. J. (2002a). Calcineurin and hypertrophic heart disease: novel insights and remaining questions. *Cardiovasc Res.* 53, 806-821.

Bueno, O. F., Wilkins, B. J., Tymitz, K. M., Glascock, B. J., Kimball, T. F., Lorenz, J. N., & Molkentin, J. D. (2002b). Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin Abeta -deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 4586-4591.

Bultynck, G., De Smet, P., Weidema, A. F., Ver, H. M., Maes, K., Callewaert, G., Missiaen, L., Parys, J. B., & De Smedt, H. (2000). Effects of the immunosuppressant FK506 on intracellular Ca²⁺ release and Ca²⁺ accumulation mechanisms. *J.Physiol* 525 Pt 3, 681-693.

Buyse, G., Trouet, D., Voets, T., Missiaen, L., Droogmans, G., Nilius, B., & Eggermont, J. (1998). Evidence for the intracellular location of chloride channel (ClC)-type proteins: co-localization of ClC-6a and ClC-6c with the sarco/endoplasmic-reticulum Ca²⁺ pump SERCA2b. *Biochem.J.* 330 (Pt 2), 1015-1021.

Byrne, N. G. & Large, W. A. (1988). Membrane ionic mechanisms activated by noradrenaline in cells isolated from the rabbit portal vein. *J.Physiol* 404, 557-573.

Callamaras, N. & Parker, I. (2000). Ca(2+)-dependent activation of Cl(-) currents in *Xenopus* oocytes is modulated by voltage. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 278, C667-C675.

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., & Snyder, S. H. (1995). Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca^{2+} flux. *Cell* 83, 463-472.

Carmody, M., Mackrill, J. J., Sorrentino, V., & O'Neill, C. (2001). FKBP12 associates tightly with the skeletal muscle type 1 ryanodine receptor, but not with other intracellular calcium release channels. *FEBS Lett.* 505, 97-102.

Casteels, R., Kitamura, K., Kuriyama, H., & Suzuki, H. (1977). The membrane properties of the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol* 271, 41-61.

Chan, H. C., Wu, W. L., So, S. C., Chung, Y. W., Tsang, L. L., Wang, X. F., Yan, Y. C., Luk, S. C., Siu, S. S., Tsui, S. K., Fung, K. P., Lee, C. Y., & Waye, M. M. (2000a). Modulation of the Ca^{2+} -activated Cl^{-} channel by 14-3-3epsilon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270, 581-587.

Chan, L. N., Wang, X. F., Tsang, L. L., & Chan, H. C. (2000b). Pyrimidinoreceptors-mediated activation of Ca^{2+} -dependent Cl^{-} conductance in mouse endometrial epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1497, 261-270.

Chantler, P. D. (1985). Calcium-dependent association of a protein complex with the lymphocyte plasma membrane: probable identity with calmodulin-calcineurin. *J Cell Biol.* 101, 207-216.

Chen, M. F. & Chen, T. Y. (2003). Side-chain charge effects and conductance determinants in the pore of ClC-0 chloride channels. *J Gen. Physiol* 122, 133-145.

Chen, T. Y., Chen, M. F., & Lin, C. W. (2003). Electrostatic control and chloride regulation of the fast gating of ClC-0 chloride channels. *J Gen. Physiol* 122, 641-651.

Cheung, W. Y. (1970). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 533-538.

Chipperfield, A. R. & Harper, A. A. (2000). Chloride in smooth muscle. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 74, 175-221.

Choby, C., Mangoni, M. E., Boccara, G., Nargeot, J., & Richard, S. (2000). Evidence for tetrodotoxin-sensitive sodium currents in primary cultured myocytes from human, pig and rabbit arteries. *Pflugers Arch.* 440, 149-152.

Clapham, D. E. (1998). The list of potential volume-sensitive chloride currents continues to swell (and shrink). *J.Gen.Physiol* 111, 623-624.

Clapp, L. H. & Gurney, A. M. (1991). Modulation of calcium movements by nitroprusside in isolated vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 418, 462-470.

Clark, A. G., Murray, D., & Ashley, R. H. (1997). Single-channel properties of a rat brain endoplasmic reticulum anion channel. *Biophys.J.* 73, 168-178.

Clarke, L. L., Grubb, B. R., Yankaskas, J. R., Cotton, C. U., McKenzie, A., & Boucher, R. C. (1994). Relationship of a non-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mediated chloride conductance to organ-level disease in *Cftr*(-/-) mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 479-483.

Coca-Prados, M., Sanchez-Torres, J., Peterson-Yantorno, K., & Civan, M. M. (1996). Association of *ClC-3* channel with Cl^- transport by human nonpigmented ciliary epithelial cells. *J.Membr.Biol.* 150, 197-208.

Cole, W. C. & Clement-Chomienne, O. (2003). ATP-Sensitive K^+ Channels of Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14, 94-103.

Cotton, K. D., Hollywood, M. A., McHale, N. G., & Thornbury, K. D. (1997). Ca^{2+} current and $\text{Ca}(2+)$ -activated chloride current in isolated smooth muscle cells of the sheep urethra. *J.Physiol* 505 (Pt 1), 121-131.

Cousin, J. L. & Motais, R. (1979). Inhibition of anion permeability by amphiphilic compounds in human red cell: evidence for an interaction of niflumic acid with the band 3 protein. *J Membr.Biol.* 46, 125-153.

Cox, R. H., Katzka, D., & Morad, M. (1992). Characteristics of calcium currents in rabbit portal vein myocytes. *Am.J.Physiol* 263, H453-H463.

Cox, R. H., Zhou, Z., & Tulenko, T. N. (1998). Voltage-gated sodium channels in human aortic smooth muscle cells. *J.Vasc.Res.* 35, 310-317.

Criddle, D. N., Meireles, A., Macedo, L. B., Leal-Cardoso, J. H., Scarparo, H. C., & Jaffar, M. (2002). Comparative inhibitory effects of niflumic acid and novel synthetic derivatives on the rat isolated stomach fundus. *J Pharm.Pharmacol.* 54, 283-288.

Cruickshank, S. F., Baxter, L. M., & Drummond, R. M. (2003). The Cl(-) channel blocker niflumic acid releases Ca(2+) from an intracellular store in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 140, 1442-1450.

Csanady, L. & Gadsby, D. C. (1999). CFTR channel gating: incremental progress in irreversible steps. *J.Gen.Physiol* 114, 49-53.

Cunningham, S. A., Awayda, M. S., Bubien, J. K., Ismailov, I. I., Arrate, M. P., Berdiev, B. K., Benos, D. J., & Fuller, C. M. (1995). Cloning of an epithelial chloride channel from bovine trachea. *J.Biol.Chem.* 270, 31016-31026.

Cuppoletti, J. & Malinowska, D. H. (1999). Ca²⁺-activated Cl⁻ channels: focus on "molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland". *Am.J.Physiol* 276, C1259-C1260.

Dai, Y. & Zhang, J. H. (2001). Role of Cl⁻ current in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281, H2159-H2167.

Davis, J. P. (1992). The effects of Na(+)-K(+)-Cl⁻ co-transport and Cl(-)-HCO₃⁻ exchange blockade on the membrane potential and intracellular chloride levels of rat arterial smooth muscle, in vitro. *Exp.Physiol* 77, 857-862.

Davis, M. J. & Hill, M. A. (1999). Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev.* 79, 387-423.

de Braekeleer, M. & Ferec, C. (1996). Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol.Hum.Reprod.* 2, 669-677.

De Greef, C., Sehrer, J., Viana, F., van Acker, K., Eggermont, J., Mertens, L., Raeymaekers, L., Droogmans, G., & Nilius, B. (1995a). Volume-activated chloride currents are not correlated with P-glycoprotein expression. *Biochem.J.* 307 (Pt 3), 713-718.

De Greef, C., van der, H. S., Viana, F., Eggermont, J., De Bruijn, E. A., Raeymaekers, L., Droogmans, G., & Nilius, B. (1995b). Lack of correlation between *mdr-1* expression and volume-activation of chloride-currents in rat colon cancer cells. *Pflugers Arch.* 430, 296-298.

De Koninck, P. & Schulman, H. (1998). Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca^{2+} oscillations. *Science* 279, 227-230.

De Windt, L. J., Lim, H. W., Taigen, T., Wencker, D., Condorelli, G., Dorn, G. W., Kitsis, R. N., & Molkentin, J. D. (2000). Calcineurin-mediated hypertrophy protects cardiomyocytes from apoptosis in vitro and in vivo: An apoptosis-independent model of dilated heart failure. *Circ.Res.* 86, 255-263.

DeMaria, C. D., Soong, T. W., Alseikhan, B. A., Alvania, R. S., & Yue, D. T. (2001). Calmodulin bifurcates the local Ca^{2+} signal that modulates P/Q-type Ca^{2+} channels. *Nature* 411, 484-489.

Deshpande, M. A., Wang, J., Preiksaitis, H. G., Laurier, L. G., & Sims, S. M. (2002). Characterization of a voltage-dependent Na^{+} current in human esophageal smooth muscle. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 283, C1045-C1055.

Dick, G. M., Bradley, K. K., Horowitz, B., Hume, J. R., & Sanders, K. M. (1998). Functional and molecular identification of a novel chloride conductance in canine colonic smooth muscle. *Am.J.Physiol* 275, C940-C950.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol.Rev.* 51, 7-61.

Duan, D., Cowley, S., Horowitz, B., & Hume, J. R. (1999). A serine residue in *ClC-3* links phosphorylation-dephosphorylation to chloride channel regulation by cell volume. *J.Gen.Physiol* 113, 57-70.

Duan, D., Winter, C., Cowley, S., Hume, J. R., & Horowitz, B. (1997). Molecular identification of a volume-regulated chloride channel. *Nature* 390, 417-421.

Duan, D., Zhong, J., Hermoso, M., Satterwhite, C. M., Rossow, C. F., Hatton, W. J., Yamboliev, I., Horowitz, B., & Hume, J. R. (2001). Functional inhibition of native volume-sensitive outwardly rectifying anion channels in muscle cells and *Xenopus* oocytes by anti-ClC-3 antibody. *J. Physiol* 531, 437-444.

duBell, W. H., Gaa, S. T., Lederer, W. J., & Rogers, T. B. (1998). Independent inhibition of calcineurin and K⁺ currents by the immunosuppressant FK-506 in rat ventricle. *Am. J. Physiol* 275, H2041-H2052.

Duggan, J. A. & Tabrizchi, R. (2000). Influence of T-type Ca²⁺ (mibefradil) and Cl⁻ (indanyloxyacetic acid 94) channel antagonists on alpha1-adrenoceptor mediated contractions in rat aorta. *Can. J Physiol Pharmacol.* 78, 714-720.

Dulhunty, A. F., Laver, D., Curtis, S. M., Pace, S., Haarmann, C., & Gallant, E. M. (2001). Characteristics of irreversible ATP activation suggest that native skeletal ryanodine receptors can be phosphorylated via an endogenous CaMKII. *Biophys. J.* 81, 3240-3252.

Duncan, R. R., Westwood, P. K., Boyd, A., & Ashley, R. H. (1997). Rat brain p64H1, expression of a new member of the p64 chloride channel protein family in endoplasmic reticulum. *J Biol. Chem.* 272, 23880-23886.

Dutzler, R., Campbell, E. B., Cadene, M., Chait, B. T., & MacKinnon, R. (2002). X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-294.

Dutzler, R., Campbell, E. B., & MacKinnon, R. (2003). Gating the selectivity filter in ClC chloride channels. *Science* 300, 108-112.

Edwards, J. C., Tulk, B., & Schlesinger, P. H. (1998). Functional expression of p64, an intracellular chloride channel protein. *J. Membr. Biol.* 163, 119-127.

Elble, R. C., Ji, G., Nehrke, K., DeBiasio, J., Kingsley, P. D., Kotlikoff, M. I., & Pauli, B. U. (2002). Molecular and functional characterization of a murine calcium-activated chloride channel expressed in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 277, 18586-18591.

Elble, R. C. & Pauli, B. U. (2001). Tumor suppression by a proapoptotic calcium-activated chloride channel in mammary epithelium. *J Biol. Chem.* 276, 40510-40517.

Elble, R. C., Widom, J., Gruber, A. D., Abdel-Ghany, M., Levine, R., Goodwin, A., Cheng, H. C., & Pauli, B. U. (1997). Cloning and characterization of lung-endothelial cell adhesion molecule-1 suggest it is an endothelial chloride channel. *J.Biol.Chem.* 272, 27853-27861.

Eliassi, A., Garneau, L., Roy, G., & Sauve, R. (1997). Characterization of a chloride-selective channel from rough endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes: evidence for a block by phosphate. *J.Membr.Biol.* 159, 219-229.

Estevez, R., Boettger, T., Stein, V., Birkenhager, R., Otto, E., Hildebrandt, F., & Jentsch, T. J. (2001). Barttin is a Cl⁻ channel beta-subunit crucial for renal Cl⁻ reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 414, 558-561.

Evans, M. G. & Marty, A. (1986). Calcium-dependent chloride currents in isolated cells from rat lacrimal glands. *J.Physiol* 378, 437-460.

Fahlke, C. (2001). Ion permeation and selectivity in ClC-type chloride channels. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 280, F748-F757.

Fahlke, C., Yu, H. T., Beck, C. L., Rhodes, T. H., & George, A. L., Jr. (1997). Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels. *Nature* 390, 529-532.

Faraci, F. M. & Heistad, D. D. (1998). Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.* 78, 53-97.

Feletou, M. & Vanhoutte, P. M. (2000). Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol.Sin.* 21, 1-18.

Feng, B. & Stemmer, P. M. (1999). Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca²⁺. *Biochemistry* 38, 12481-12489.

Ferri, A., Gabbianelli, R., Casciati, A., Paolucci, E., Rotilio, G., & Carri, M. T. (2000). Calcineurin activity is regulated both by redox compounds and by mutant familial amyotrophic lateral sclerosis-superoxide dismutase. *J.Neurochem.* 75, 606-613.

Fisher, S. E., Black, G. C., Lloyd, S. E., Hatchwell, E., Wrong, O., Thakker, R. V., & Craig, I. W. (1994). Isolation and partial characterization of a chloride

channel gene which is expressed in kidney and is a candidate for Dent's disease (an X-linked hereditary nephrolithiasis). *Hum.Mol.Genet.* 3, 2053-2059.

Fleischmann, B. K., Murray, R. K., & Kotlikoff, M. I. (1994). Voltage window for sustained elevation of cytosolic calcium in smooth muscle cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 11914-11918.

Fondation Canadienne de la Fibrose Kystique. www.fibrosekystique.ca . 2004.

Ref Type: Electronic Citation

Foskett, J. K. (1998). CIC and CFTR chloride channel gating. *Annu.Rev.Physiol* 60, 689-717.

Frapier, J. M., Choby, C., Mangoni, M. E., Nargeot, J., Albat, B., & Richard, S. (2001). Cyclosporin A increases basal intracellular calcium and calcium responses to endothelin and vasopressin in human coronary myocytes. *FEBS Lett.* 493, 57-62.

Frings, S., Reuter, D., & Kleene, S. J. (2000). Neuronal Ca^{2+} -activated Cl^- channels--homing in on an elusive channel species. *Prog.Neurobiol.* 60, 247-289.

Fuller, C. M. & Benos, D. J. (2000a). Ca^{2+} -Activated Cl^- Channels: A Newly Emerging Anion Transport Family. *News Physiol Sci.* 15, 165-171.

Fuller, C. M. & Benos, D. J. (2000b). Electrophysiological characteristics of the Ca^{2+} -activated Cl^- channel family of anion transport proteins. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 27, 906-910.

Fuller, C. M. & Benos, D. J. (2002). Electrophysiology of the CLCA family. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 389-414. Academic Press.

Fuller, C. M., Ismailov, I. I., Keeton, D. A., & Benos, D. J. (1994). Phosphorylation and activation of a bovine tracheal anion channel by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol.Chem.* 269, 26642-26650.

Fuller, C. M., Ji, H. L., Tousson, A., Elble, R. C., Pauli, B. U., & Benos, D. J. (2001). Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels: a newly emerging anion transport family. *Pflugers Arch.* 443 Suppl 1, S107-S110.

Furst, J., Gschwentner, M., Ritter, M., Botta, G., Jakab, M., Mayer, M., Garavaglia, L., Bazzini, C., Rodighiero, S., Meyer, G., Eichmuller, S., Woll, E., & Paulmichl, M. (2002). Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. *Pflugers Arch.* 444, 1-25.

Furukawa, T., Ogura, T., Katayama, Y., & Hiraoka, M. (1998). Characteristics of rabbit ClC-2 current expressed in *Xenopus* oocytes and its contribution to volume regulation. *Am.J.Physiol* 274, C500-C512.

Gabriel, S. E., Clarke, L. L., Boucher, R. C., & Stutts, M. J. (1993). CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. *Nature* 363, 263-268.

Gadsby, D. C. (2004). Ion transport: spot the difference. *Nature* 427, 795-797.

Gadsby, D. C. & Nairn, A. C. (1999). Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev.* 79, S77-S107.

Gandhi, R., Elble, R. C., Gruber, A. D., Schreur, K. D., Ji, H. L., Fuller, C. M., & Pauli, B. U. (1998). Molecular and functional characterization of a calcium-sensitive chloride channel from mouse lung. *J.Biol.Chem.* 273, 32096-32101.

Gardoni, F., Schrama, L. H., Kamal, A., Gispen, W. H., Cattabeni, F., & Di Luca, M. (2001). Hippocampal synaptic plasticity involves competition between Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II and postsynaptic density 95 for binding to the NR2A subunit of the NMDA receptor. *J.Neurosci.* 21, 1501-1509.

Gardoni, F., Schrama, L. H., van Dalen, J. J., Gispen, W. H., Cattabeni, F., & Di Luca, M. (1999). αCaMKII binding to the C-terminal tail of NMDA receptor subunit NR2A and its modulation by autophosphorylation. *FEBS Lett.* 456, 394-398.

Gaspar, K. J., Racette, K. J., Gordon, J. R., Loewen, M. E., & Forsyth, G. W. (2000). Cloning a chloride conductance mediator from the apical membrane of porcine ileal enterocytes. *Physiol Genomics* 3, 101-111.

Gerhardstein, B. L., Gao, T., Bunemann, M., Puri, T. S., Adair, A., Ma, H., & Hosey, M. M. (2000). Proteolytic processing of the C terminus of the $\alpha(1C)$ subunit of L-type calcium channels and the role of a proline-rich domain in membrane tethering of proteolytic fragments. *J Biol.Chem.* 275, 8556-8563.

Ghetti, A. & Heinemann, S. F. (2000). NMDA-Dependent modulation of hippocampal kainate receptors by calcineurin and $Ca(2+)$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci.* 20, 2766-2773.

Giovannucci, D. R., Bruce, J. I., Straub, S. V., Arreola, J., Sneyd, J., Shuttleworth, T. J., & Yule, D. I. (2002). Cytosolic $Ca(2+)$ and $Ca(2+)$ -activated $Cl(-)$ current dynamics: insights from two functionally distinct mouse exocrine cells. *J Physiol* 540, 469-484.

Gleason, M. R., Higashijima, S., Dallman, J., Liu, K., Mandel, G., & Fetcho, J. R. (2003). Translocation of CaM kinase II to synaptic sites in vivo. *Nat.Neurosci.* 6, 217-218.

Goldspink, P. H., McKinney, R. D., Kimball, V. A., Geenen, D. L., & Buttrick, P. M. (2001). Angiotensin II induced cardiac hypertrophy in vivo is inhibited by cyclosporin A in adult rats. *Mol.Cell Biochem.* 226, 83-88.

Gordjani, N., Epting, T., Fischer-Riepe, P., Greger, R. F., Brandis, M., Leipziger, J., & Nitschke, R. (2000). Cyclosporin-A-induced effects on the free Ca^{2+} concentration in LLC-PK1-cells and their mechanisms. *Pflugers Arch.* 439, 627-633.

Gottlieb, R. A., Giesing, H. A., Engler, R. L., & Babior, B. M. (1995). The acid deoxyribonuclease of neutrophils: a possible participant in apoptosis-associated genome destruction. *Blood* 86, 2414-2418.

Greenwood, I. A., Helliwell, R. M., & Large, W. A. (1997). Modulation of $Ca(2+)$ -activated Cl^{-} currents in rabbit portal vein smooth muscle by an inhibitor of mitochondrial Ca^{2+} uptake. *J.Physiol* 505 (Pt 1), 53-64.

Greenwood, I. A., Hogg, R. C., & Large, W. A. (1995). Effect of frusemide, ethacrynic acid and indanyloxyacetic acid on spontaneous Ca -activated currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 115, 733-738.

Greenwood, I. A. & Large, W. A. (1995). Comparison of the effects of fenamates on Ca-activated chloride and potassium currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 116, 2939-2948.

Greenwood, I. A. & Large, W. A. (1996). Analysis of the time course of calcium-activated chloride "tail" currents in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 432, 970-979.

Greenwood, I. A. & Large, W. A. (1998). Properties of a Cl⁻ current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* 275, H1524-H1532.

Greenwood, I. A. & Large, W. A. (1999). Modulation of the decay of Ca²⁺-activated Cl⁻ currents in rabbit portal vein smooth muscle cells by external anions. *J.Physiol* 516 (Pt 2), 365-376.

Greenwood, I. A., Leblanc, N., Gordienko, D. V., & Large, W. A. (2002a). Modulation of I_{Cl(Ca)} in vascular smooth muscle cells by oxidizing and cysteine-reactive reagents. *Pflugers Arch.* 443, 473-482.

Greenwood, I. A., Ledoux, J., & Leblanc, N. (2001). Differential regulation of Ca(2+)-activated Cl(-) currents in rabbit arterial and portal vein smooth muscle cells by Ca(2+)-calmodulin-dependent kinase. *J.Physiol* 534, 395-408.

Greenwood, I. A., Miller, L. J., Ohya, S., & Horowitz, B. (2002b). The large conductance potassium channel beta-subunit can interact with and modulate the functional properties of a calcium-activated chloride channel, CLCA1. *J.Biol.Chem.* 277, 22119-22122.

Gribkoff, V. K., Lum-Ragan, J. T., Boissard, C. G., Post-Munson, D. J., Meanwell, N. A., Starrett, J. E., Jr., Kozlowski, E. S., Romine, J. L., Trojnacki, J. T., McKay, M. C., Zhong, J., & Dworetzky, S. I. (1996). Effects of channel modulators on cloned large-conductance calcium-activated potassium channels. *Mol.Pharmacol.* 50, 206-217.

Grubb, B. R. & Boucher, R. C. (1999). Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. *Physiol Rev.* 79, S193-S214.

Grubb, B. R., Paradiso, A. M., & Boucher, R. C. (1994a). Anomalies in ion transport in CF mouse tracheal epithelium. *Am.J.Physiol* 267, C293-C300.

Grubb, B. R., Vick, R. N., & Boucher, R. C. (1994b). Hyperabsorption of Na⁺ and raised Ca(2+)-mediated Cl⁻ secretion in nasal epithelia of CF mice. *Am.J.Physiol* 266, C1478-C1483.

Gruber, A. D., Elble, R. C., Ji, H. L., Schreur, K. D., Fuller, C. M., & Pauli, B. U. (1998a). Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel proteins. *Genomics* 54, 200-214.

Gruber, A. D., Elble, R. C., & Pauli, B. U. (2002). Discovery and cloning of the CLCA gene family. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 368-388. Academic Press.

Gruber, A. D., Gandhi, R., & Pauli, B. U. (1998b). The murine calcium-sensitive chloride channel (mCaCC) is widely expressed in secretory epithelia and in other select tissues. *Histochem.Cell Biol.* 110, 43-49.

Gruber, A. D. & Pauli, B. U. (1999a). Molecular cloning and biochemical characterization of a truncated, secreted member of the human family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels. *Biochim.Biophys.Acta* 1444, 418-423.

Gruber, A. D. & Pauli, B. U. (1999b). Tumorigenicity of human breast cancer is associated with loss of the Ca²⁺-activated chloride channel CLCA2. *Cancer Res.* 59, 5488-5491.

Gruber, A. D., Schreur, K. D., Ji, H. L., Fuller, C. M., & Pauli, B. U. (1999). Molecular cloning and transmembrane structure of hCLCA2 from human lung, trachea, and mammary gland. *Am.J.Physiol* 276, C1261-C1270.

Grunder, S., Thiemann, A., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1992). Regions involved in the opening of CIC-2 chloride channel by voltage and cell volume. *Nature* 360, 759-762.

Guibert, C., Marthan, R., & Savineau, J. P. (1997). Oscillatory Cl⁻ current induced by angiotensin II in rat pulmonary arterial myocytes: Ca²⁺ dependence and physiological implication. *Cell Calcium* 21, 421-429.

Hamill, O. P. & McBride, D. W., Jr. (1994). The cloning of a mechano-gated membrane ion channel. *Trends Neurosci.* 17, 439-443.

Hamilton, S. L., Serysheva, I., & Strasburg, G. M. (2000). Calmodulin and Excitation-Contraction Coupling. *News Physiol Sci.* 15, 281-284.

Hanson, P. I. & Schulman, H. (1992). Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Annu.Rev.Biochem.* 61, 559-601.

Harrop, S. J., DeMaere, M. Z., Fairlie, W. D., Reztsova, T., Valenzuela, S. M., Mazzanti, M., Tonini, R., Qiu, M. R., Jankova, L., Warton, K., Bauskin, A. R., Wu, W. M., Pankhurst, S., Campbell, T. J., Breit, S. N., & Curmi, P. M. (2001). Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution. *J.Biol.Chem.* 276, 44993-45000.

Hell, J. W., Westenbroek, R. E., Breeze, L. J., Wang, K. K., Chavkin, C., & Catterall, W. A. (1996). N-methyl-D-aspartate receptor-induced proteolytic conversion of postsynaptic class C L-type calcium channels in hippocampal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 3362-3367.

Hemenway, C. S. & Heitman, J. (1999). Calcineurin. Structure, function, and inhibition. *Cell Biochem.Biophys.* 30, 115-151.

Hermoso, M., Satterwhite, C. M., Andrade, Y. N., Hidalgo, J., Wilson, S. M., Horowitz, B., & Hume, J. R. (2002). ClC-3 is a fundamental molecular component of volume-sensitive outwardly rectifying Cl^- channels and volume regulation in HeLa cells and *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol.Chem.* 277, 40066-40074.

Herzig, S. & Neumann, J. (2000). Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev.* 80, 173-210.

Hidaka, H., Hagiwara, M., & Tokumitsu, H. (1990). Novel and selective inhibitors of CaM-kinase II and other calmodulin-dependent enzymes. *Adv.Exp.Med.Biol.* 269, 159-162.

Hidaka, H. & Yokokura, H. (1996). Molecular and cellular pharmacology of a calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM kinase II) inhibitor, KN-62, and proposal of CaM kinase phosphorylation cascades. *Adv.Pharmacol.* 36, 193-219.

Hill-Eubanks, D. C., Gomez, M. F., Stevenson, A. S., & Nelson, M. T. (2003). NFAT regulation in smooth muscle. *Trends Cardiovasc.Med.* 13, 56-62.

Hille, B. (1992). *Ion channels of excitable membranes*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc..

Hirakawa, Y., Gericke, M., Cohen, R. A., & Bolotina, V. M. (1999). Ca(2+)-dependent Cl(-) channels in mouse and rabbit aortic smooth muscle cells: regulation by intracellular Ca(2+) and NO. *Am.J.Physiol* 277, H1732-H1744.

Ho, M. W., Kaetzel, M. A., Armstrong, D. L., & Shears, S. B. (2001). Regulation of a human chloride channel. a paradigm for integrating input from calcium, type ii calmodulin-dependent protein kinase, and inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J.Biol.Chem.* 276, 18673-18680.

Ho, M. W. & Shears, S. B. (2002). Regulation of calcium-activated chloride channels by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 345-367. Academic Press.

Hoffmann, E. K. (2000). Intracellular signalling involved in volume regulatory decrease. *Cell Physiol Biochem.* 10, 273-288.

Hogg, R. C., Wang, Q., & Large, W. A. (1993). Time course of spontaneous calcium-activated chloride currents in smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J.Physiol* 464, 15-31.

Hogg, R. C., Wang, Q., & Large, W. A. (1994a). Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br.J.Pharmacol.* 112, 977-984.

Hogg, R. C., Wang, Q., & Large, W. A. (1994b). Effects of Cl channel blockers on Ca-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br.J.Pharmacol.* 111, 1333-1341.

Holman, M. E., Kasby, C. B., Suthers, M. B., & Wilson, J. A. (1968). Some properties of the smooth muscle of rabbit portal vein. *J Physiol* 196, 111-132.

Hook, S. S. & Means, A. R. (2001). Ca(2+)/CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41, 471-505.

Hudmon, A. & Schulman, H. (2002a). Neuronal Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu.Rev.Biochem.* 71, 473-510.

Hudmon, A. & Schulman, H. (2002b). Structure-function of the multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem.J.* 364, 593-611.

Hughey, R. P., Mueller, G. M., Bruns, J. B., Kinlough, C. L., Poland, P. A., Harkleroad, K. L., Carattino, M. D., & Kleyman, T. R. (2003). Maturation of the epithelial Na^{+} channel involves proteolytic processing of the alpha- and gamma-subunits. *J Biol.Chem.* 278, 37073-37082.

Hume, J. R. & Leblanc, N. (1989). Macroscopic K^{+} currents in single smooth muscle cells of the rabbit portal vein. *J Physiol* 413, 49-73.

Hwang, T. C. & Sheppard, D. N. (1999). Molecular pharmacology of the CFTR Cl^{-} channel. *Trends Pharmacol.Sci.* 20, 448-453.

Ishida, A., Kameshita, I., Okuno, S., Kitani, T., & Fujisawa, H. (1995). A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 212, 806-812.

Ishida, A., Okuno, S., Kitani, T., Kameshita, I., & Fujisawa, H. (1998). Regulation of multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase phosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 253, 159-163.

Ismailov, I. I., Fuller, C. M., Berdiev, B. K., Shlyonsky, V. G., Benos, D. J., & Barrett, K. E. (1996). A biologic function for an "orphan" messenger: D-myo-inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate selectively blocks epithelial calcium-activated chloride channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 10505-10509.

Itoh, R., Kawamoto, S., Miyamoto, Y., Kinoshita, S., & Okubo, K. (2000). Isolation and characterization of a Ca^{2+} -activated chloride channel from human corneal epithelium. *Curr.Eye Res.* 21, 918-925.

Jackson, P. S., Morrison, R., & Strange, K. (1994). The volume-sensitive organic osmolyte-anion channel VSOAC is regulated by nonhydrolytic ATP binding. *Am.J Physiol* 267, C1203-C1209.

Jaggar, J. H., Porter, V. A., Lederer, W. J., & Nelson, M. T. (2000). Calcium sparks in smooth muscle. *Am.J Physiol Cell Physiol* 278, C235-C256.

Janssen, L. J. & Sims, S. M. (1994). Spontaneous transient inward currents and rhythmicity in canine and guinea-pig tracheal smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 427, 473-480.

Jentsch, T. J., Friedrich, T., Schriever, A., & Yamada, H. (1999). The CLC chloride channel family. *Pflugers Arch.* 437, 783-795.

Jentsch, T. J. & Gunther, W. (1997). Chloride channels: an emerging molecular picture. *Bioessays* 19, 117-126.

Jentsch, T. J., Stein, V., Weinreich, F., & Zdebik, A. A. (2002). Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 82, 503-568.

Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., & Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* 348, 510-514.

Ji, H. L., DuVall, M. D., Patton, H. K., Satterfield, C. L., Fuller, C. M., & Benos, D. J. (1998). Functional expression of a truncated $\text{Ca}(2+)$ -activated Cl^- channel and activation by phorbol ester. *Am.J.Physiol* 274, C455-C464.

Jia, Y., Mathews, C. J., & Hanrahan, J. W. (1997). Phosphorylation by protein kinase C is required for acute activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by protein kinase A. *J.Biol.Chem.* 272, 4978-4984.

Jin, L. & Harrison, S. C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99, 13522-13526.

Jovov, B., Berdiev, B. K., Fuller, C. M., Ji, H. L., & Benos, D. J. (2002). The serine protease trypsin cleaves C termini of beta- and gamma-subunits of epithelial Na^+ channels. *J Biol.Chem.* 277, 4134-4140.

Kakita, T., Hasegawa, K., Iwai-Kanai, E., Adachi, S., Morimoto, T., Wada, H., Kawamura, T., Yanazume, T., & Sasayama, S. (2001). Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes. *Circ.Res.* 88, 1239-1246.

Kakiuchi, S. & Yamazaki, R. (1970). Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 41, 1104-1110.

Kawasaki, M., Uchida, S., Monkawa, T., Miyawaki, A., Mikoshiba, K., Marumo, F., & Sasaki, S. (1994). Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells. *Neuron* 12, 597-604.

Kayyali, U. S., Zhang, W., Yee, A. G., Seidman, J. G., & Potter, H. (1997). Cytoskeletal changes in the brains of mice lacking calcineurin A alpha. *J Neurochem.* 68, 1668-1678.

Kedzierski, R. M. & Yanagisawa, M. (2001). Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 41, 851-876.

Keef, K. D., Hume, J. R., & Zhong, J. (2001). Regulation of cardiac and smooth muscle Ca(2+) channels (Ca(V)1.2a,b) by protein kinases. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C1743-C1756.

Khalil, A., Carrier, M., Latour, J. G., & Pelletier, L. C. (1996). Cyclosporin A-induced coronary artery vasoconstriction through myogenic and endothelium-dependent mechanisms. *Circulation* 94, II308-II311.

Kidd, J. F. & Thorn, P. (2000). Intracellular Ca²⁺ and Cl⁻ channel activation in secretory cells. *Annu.Rev.Physiol* 62, 493-513.

Kim, S. A., Hudmon, A., Volmer, A., & Waxham, M. N. (2001). CaM-kinase II dephosphorylates Thr(286) by a reversal of the autophosphorylation reaction. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 282, 773-780.

Kim, S. J., Shin, S. Y., Lee, J. E., Kim, J. H., & Uhm, D. Y. (2003). Ca²⁺-activated Cl⁻ channel currents in rat ventral prostate epithelial cells. *Prostate* 55, 118-127.

Kirk, K. L. (2000). New paradigms of CFTR chloride channel regulation. *Cell Mol.Life Sci.* 57, 623-634.

Kirkup, A. J., Edwards, G., Green, M. E., Miller, M., Walker, S. D., & Weston, A. H. (1996). Modulation of membrane currents and mechanical activity by niflumic acid in rat vascular smooth muscle. *Eur.J Pharmacol.* 317, 165-174.

Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W., & . (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* 378, 641-644.

Klee, C. B., Ren, H., & Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J.Biol.Chem.* 273, 13367-13370.

Klockner, U. (1993). Intracellular calcium ions activate a low-conductance chloride channel in smooth-muscle cells isolated from human mesenteric artery. *Pflugers Arch.* 424, 231-237.

Klockner, U. & Isenberg, G. (1991). Endothelin depolarizes myocytes from porcine coronary and human mesenteric arteries through a Ca-activated chloride current. *Pflugers Arch.* 418, 168-175.

Knot, H. J., Brayden, J. E., & Nelson, M. T. (1996). Calcium channels and potassium channels. In *Biochemistry of smooth muscle contraction*, ed. Barany, M., pp. 203-220. Academic Press.

Koch, M. C., Steinmeyer, K., Lorenz, C., Ricker, K., Wolf, F., Otto, M., Zoll, B., Lehmann-Horn, F., Grzeschik, K. H., & Jentsch, T. J. (1992). The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia. *Science* 257, 797-800.

Kolodziej, S. J., Hudmon, A., Waxham, M. N., & Stoops, J. K. (2000). Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase IIalpha and truncated CaM kinase IIalpha reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J.Biol.Chem.* 275, 14354-14359.

Komaru, T., Kanatsuka, H., & Shirato, K. (2000). Coronary microcirculation: physiology and pharmacology. *Pharmacol.Ther.* 86, 217-261.

Komiya, T., Tanigawa, Y., & Hirohashi, S. (1999). Cloning and identification of the gene *gob-5*, which is expressed in intestinal goblet cells in mice. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 255, 347-351.

Konopitzky, R., Konig, U., Meyer, R. G., Sommergruber, W., Wolfel, T., & Schweighoffer, T. (2002). Identification of HLA-A*0201-restricted T cell epitopes derived from the novel overexpressed tumor antigen calcium-activated chloride channel 2. *J.Immunol.* 169, 540-547.

Kopito, R. R. (1999). Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev.* 79, S167-S173.

Kornak, U., Kasper, D., Bosl, M. R., Kaiser, E., Schweizer, M., Schulz, A., Friedrich, W., Dellling, G., & Jentsch, T. J. (2001). Loss of the *ClC-7* chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell* 104, 205-215.

Kourie, J. I., Laver, D. R., Ahern, G. P., & Dulhunty, A. F. (1996a). A calcium-activated chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Am.J.Physiol* 270, C1675-C1686.

Kourie, J. I., Laver, D. R., Junankar, P. R., Gage, P. W., & Dulhunty, A. F. (1996b). Characteristics of two types of chloride channel in sarcoplasmic reticulum vesicles from rabbit skeletal muscle. *Biophys.J.* 70, 202-221.

Kunzelmann, K. (1999). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and its function in epithelial transport. *Rev.Physiol Biochem.Pharmacol.* 137, 1-70.

Kunzelmann, K. (2001). CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci.* 16, 167-170.

Kunzelmann, K., Mall, M., Briel, M., Hipper, A., Nitschke, R., Ricken, S., & Greger, R. (1997). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca^{2+} activated Cl^{-} conductance of *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 435, 178-181.

Kunzelmann, K. & Schreiber, R. (1999). CFTR, a regulator of channels. *J.Membr.Biol.* 168, 1-8.

Kuriyama, H., Kitamura, K., & Nabata, H. (1995). Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. *Pharmacol.Rev.* 47, 387-573.

Kuruma, A. & Hartzell, H. C. (2000). Bimodal control of a $\text{Ca}(2+)$ -activated $\text{Cl}(-)$ channel by different $\text{Ca}(2+)$ signals. *J.Gen.Physiol* 115, 59-80.

Lamb, F. S. & Barna, T. J. (1998a). Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am.J.Physiol* 275, H151-H160.

Lamb, F. S. & Barna, T. J. (1998b). The endothelium modulates the contribution of chloride currents to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am.J.Physiol* 275, H161-H168.

Lamb, F. S., Volk, K. A., & Shibata, E. F. (1994). Calcium-activated chloride current in rabbit coronary artery myocytes. *Circ.Res.* 75, 742-750.

Large, W. A., Greenwood, I. A., & Piper, A. S. (2002). Recent advances on the properties and role of Ca^{2+} -activated chloride currents in smooth muscle. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 99-118. Academic Press.

Large, W. A. & Wang, Q. (1996). Characteristics and physiological role of the $\text{Ca}(2+)$ -activated Cl^- conductance in smooth muscle. *Am.J.Physiol* 271, C435-C454.

Leblanc, N. & Leung, P. M. (1995). Indirect stimulation of $\text{Ca}(2+)$ -activated Cl^- current by $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange in rabbit portal vein smooth muscle. *Am.J.Physiol* 268, H1906-H1917.

Leblanc, N. & Lupien, M. A. (1997). Regulation of Ca^{2+} -dependent Cl^- channels by calmodulin-dependent protein kinase II in vascular myocytes. *Biophys.J.* 72, A33.

Leblanc, N., Wan, X., & Leung, P. M. (1994). Physiological role of $\text{Ca}(2+)$ -activated and voltage-dependent K^+ currents in rabbit coronary myocytes. *Am.J.Physiol* 266, C1523-C1537.

Ledoux, J., Chartier, D., & Leblanc, N. (1999). Inhibitors of calmodulin-dependent protein kinase are nonspecific blockers of voltage-dependent K⁺ channels in vascular myocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290, 1165-1174.

Lee, D., Ha, S., Kho, Y., Kim, J., Cho, K., Baik, M., & Choi, Y. (1999). Induction of mouse Ca(2+)-sensitive chloride channel 2 gene during involution of mammary gland. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 264, 933-937.

Leinwand, L. A. (2001). Calcineurin inhibition and cardiac hypertrophy: a matter of balance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 2947-2949.

Leverkoehne, I., Horstmeier, B. A., Samson-Himmelstjerna, G., Scholte, B. J., & Gruber, A. D. (2002). Real-time RT-PCR quantitation of mCLCA1 and mCLCA2 reveals differentially regulated expression in pre- and postnatal murine tissues. *Histochem.Cell Biol.* 118, 11-17.

Li, L., Vapaatalo, H., Vaali, K., Paakkari, I., & Kankaanranta, H. (1998). Flufenamic and tolfenamic acids and lemakalim relax guinea-pig isolated trachea by different mechanisms. *Life Sci.* 62, L-8.

Li, X., Shimada, K., Showalter, L. A., & Weinman, S. A. (2000). Biophysical properties of ClC-3 differentiate it from swelling-activated chloride channels in Chinese hamster ovary-K1 cells. *J.Biol.Chem.* 275, 35994-35998.

Lim, H. W., De Windt, L. J., Mante, J., Kimball, T. R., Witt, S. A., Sussman, M. A., & Molkentin, J. D. (2000). Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J.Mol.Cell Cardiol.* 32, 697-709.

Lisman, J. (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 17, 406-412.

Lisman, J., Schulman, H., & Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat.Rev.Neurosci.* 3, 175-190.

Liu, X. & Farley, J. M. (1996a). Acetylcholine-induced Ca⁺⁺-dependent chloride current oscillations are mediated by inositol 1,4,5-trisphosphate in tracheal myocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 277, 796-804.

Liu, X. & Farley, J. M. (1996b). Acetylcholine-induced chloride current oscillations in swine tracheal smooth muscle cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 276, 178-186.

Lledo, P. M., Hjelmstad, G. O., Mukherji, S., Soderling, T. R., Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. (1995). Calcium/calmodulin-dependent kinase II and long-term potentiation enhance synaptic transmission by the same mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92, 11175-11179.

Loewen, M. E., Bekar, L. K., Gabriel, S. E., Walz, W., & Forsyth, G. W. (2002a). pCLCA1 becomes a cAMP-dependent chloride conductance mediator in Caco-2 cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 298, 531-536.

Loewen, M. E., Gabriel, S. E., & Forsyth, G. W. (2002b). The calcium-dependent chloride conductance mediator pCLCA1. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 283, C412-C421.

Lorenz, C., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1996). Heteromultimeric CLC chloride channels with novel properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 13362-13366.

Ludewig, U., Pusch, M., & Jentsch, T. J. (1996). Two physically distinct pores in the dimeric CLC-0 chloride channel. *Nature* 383, 340-343.

Lukas, T. J., Mirzoeva, S., & Watterson, D. M. (1998). Calmodulin-regulated protein kinases. In *Calmodulin and signal transduction*, eds. Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M., pp. 66-169. Academic Press, New York.

Luyckx, V. A., Leclercq, B., Dowland, L. K., & Yu, A. S. (1999). Diet-dependent hypercalciuria in transgenic mice with reduced CLC5 chloride channel expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 12174-12179.

MacCarthy, P. A., Pegge, N. C., Prendergast, B. D., Shah, A. M., & Groves, P. H. (2001). The physiological role of endogenous endothelin in the regulation of human coronary vasomotor tone. *J.Am.Coll.Cardiol.* 37, 137-143.

Machaca, K., Qu, Z., Kuruma, A., Hartzell, H. C., & McCarty, N. A. (2002). The endogenous calcium-activated Cl⁻ channel in *Xenopus* Oocytes: a physiological and biophysically rich model system. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 4-40. Academic Press.

Mackrill, J. J. (1999). Protein-protein interactions in intracellular Ca^{2+} -release channel function. *Biochem.J.* 337 (Pt 3), 345-361.

Maduke, M., Miller, C., & Mindell, J. A. (2000). A decade of CLC chloride channels: structure, mechanism, and many unsettled questions. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 29, 411-438.

Maertens, C., Wei, L., Droogmans, G., & Nilius, B. (2000). Inhibition of volume-regulated and calcium-activated chloride channels by the antimalarial mefloquine. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 295, 29-36.

Makhinson, M., Chotiner, J. K., Watson, J. B., & O'Dell, T. J. (1999). Adenylyl cyclase activation modulates activity-dependent changes in synaptic strength and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II autophosphorylation. *J.Neurosci.* 19, 2500-2510.

Malosio, M. L., Marqueze-Pouey, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1991). Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10, 2401-2409.

Marin, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E. C., & Alonso, M. J. (1999). Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci.* 64, 279-303.

Marmorstein, A. D., Marmorstein, L. Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J. G., & Petrukhin, K. (2000). Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 12758-12763.

Marmorstein, L. Y., McLaughlin, P. J., Stanton, J. B., Yan, L., Crabb, J. W., & Marmorstein, A. D. (2002). Bestrophin Interacts Physically and Functionally with Protein Phosphatase 2A. *Journal of Biological Chemistry* 277, 30591-30597.

Marunaka, Y., Niisato, N., & Shintani, Y. (1998). Protein phosphatase 2B-dependent pathway of insulin action on single Cl^- channel conductance in renal epithelium. *J Membr.Biol.* 161, 235-245.

Matsuda, J. J., Volk, K. A., & Shibata, E. F. (1990). Calcium currents in isolated rabbit coronary arterial smooth muscle myocytes. *J.Physiol* 427, 657-680.

Matsuda, S. & Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology* 47, 119-125.

Matsumura, Y., Uchida, S., Kondo, Y., Miyazaki, H., Ko, S. B., Hayama, A., Morimoto, T., Liu, W., Arisawa, M., Sasaki, S., & Marumo, F. (1999). Overt nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking the CLC-K1 chloride channel. *Nat. Genet.* 21, 95-98.

McDonald, T. F., Pelzer, S., Trautwein, W., & Pelzer, D. J. (1994). Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 74, 365-507.

McGill, J. M., Yen, M. S., Basavappa, S., Mangel, A. W., & Kwiatkowski, A. P. (1995). ATP-activated chloride permeability in biliary epithelial cells is regulated by calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 457-462.

McNicholas, C. M., Guggino, W. B., Schwiebert, E. M., Hebert, S. C., Giebisch, G., & Egan, M. E. (1996). Sensitivity of a renal K⁺ channel (ROMK2) to the inhibitory sulfonylurea compound glibenclamide is enhanced by coexpression with the ATP-binding cassette transporter cystic fibrosis transmembrane regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93, 8083-8088.

Meyer, T., Hanson, P. I., Stryer, L., & Schulman, H. (1992). Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. *Science* 256, 1199-1202.

Middleton, R. E., Pheasant, D. J., & Miller, C. (1996). Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383, 337-340.

Miller, C. & White, M. M. (1984). Dimeric structure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 81, 2772-2775.

Millward, T. A., Zolnierowicz, S., & Hemmings, B. A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.* 24, 186-191.

Mindell, J. A., Maduke, M., Miller, C., & Grigorieff, N. (2001). Projection structure of a ClC-type chloride channel at 6.5 Å resolution. *Nature* 409, 219-223.

Mironneau, J., Arnaudeau, S., Macrez-Lepretre, N., & Boittin, F. X. (1996). Ca^{2+} sparks and Ca^{2+} waves activate different Ca^{2+} -dependent ion channels in single myocytes from rat portal vein. *Cell Calcium* 20, 153-160.

Miyauchi, T. & Masaki, T. (1999). Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu.Rev.Physiol* 61, 391-415.

Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., & Olson, E. N. (1998). A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 93, 215-228.

Morin, X. K., Bond, T. D., Loo, T. W., Clarke, D. M., & Bear, C. E. (1995). Failure of P-glycoprotein (MDR1) expressed in *Xenopus* oocytes to produce swelling-activated chloride channel activity. *J.Physiol* 486 (Pt 3), 707-714.

Morris, A. P. (1999). The regulation of epithelial cell cAMP- and calcium-dependent chloride channels. *Adv.Pharmacol.* 46, 209-251.

Morris, A. P. & Frizzell, R. A. (1993a). Ca^{2+} -dependent Cl^- channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29). I. Single-channel properties. *Am.J.Physiol* 264, C968-C976.

Morris, A. P. & Frizzell, R. A. (1993b). Ca^{2+} -dependent Cl^- channels in undifferentiated human colonic cells (HT-29). II. Regulation and rundown. *Am.J.Physiol* 264, C977-C985.

Morris, E. P. & Torok, K. (2001). Oligomeric structure of alpha-calmodulin-dependent protein kinase II. *J.Mol.Biol.* 308, 1-8.

Musch, M. W., Davis-Amaral, E. M., Vandeburgh, H. H., & Goldstein, L. (1998). Hypotonicity stimulates translocation of ICln in neonatal rat cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* 436, 415-422.

Nagel, W., Somieski, P., & Katz, U. (2001). Selective inhibition of Cl^- conductance in toad skin by blockers of Cl^- channels and transporters. *Am.J.Physiol Cell Physiol* 281, C1223-C1232.

Nakanishi, A., Morita, S., Iwashita, H., Sagiya, Y., Ashida, Y., Shirafuji, H., Fujisawa, Y., Nishimura, O., & Fujino, M. (2001). Role of gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 5175-5180.

Nehrke, K., Arreola, J., Nguyen, H. V., Pilato, J., Richardson, L., Okunade, G., Baggs, R., Shull, G. E., & Melvin, J. E. (2002). Loss of hyperpolarization-activated Cl(-) current in salivary acinar cells from Clcn2 knockout mice. *J Biol.Chem.* 277, 23604-23611.

Nelson, M. R. & Chazin, W. J. (1998). Calmodulin as a calcium sensor. In *Calmodulin and signal transduction*, eds. Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M., pp. 17-65. Academic Press, New York.

Nelson, M. T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L. F., Bonev, A. D., Knot, H. J., & Lederer, W. J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* 270, 633-637.

Nelson, M. T., Patlak, J. B., Worley, J. F., & Standen, N. B. (1990). Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am.J.Physiol* 259, C3-18.

Nelson, M. T. & Quayle, J. M. (1995). Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am.J.Physiol* 268, C799-C822.

Nilius, B. (2001). Chloride channels go cell cycling. *J.Physiol* 532, 581.

Nilius, B. & Droogmans, G. (2002). Calcium-activated chloride channels in vascular endothelial cells. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 327-344. Academic Press.

Nilius, B. & Droogmans, G. (2003). Amazing chloride channels: an overview. *Acta Physiol Scand.* 177, 119-147.

Nilius, B., Prenen, J., Voets, T., Eggermont, J., & Droogmans, G. (1998). Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells. *J Physiol* 506 (Pt 2), 353-361.

Nishimoto, I., Wagner, J. A., Schulman, H., & Gardner, P. (1991). Regulation of Cl⁻ channels by multifunctional CaM kinase. *Neuron* 6, 547-555.

Nishizawa, T., Nagao, T., Iwatsubo, T., Forte, J. G., & Urushidani, T. (2000). Molecular cloning and characterization of a novel chloride intracellular channel-related protein, parchorin, expressed in water-secreting cells. *J.Biol.Chem.* 275, 11164-11173.

Oba, T., Koshita, M., & Van Helden, D. F. (1996). Modulation of frog skeletal muscle Ca²⁺ release channel gating by anion channel blockers. *Am.J.Physiol* 271, C819-C824.

Okabe, K., Kitamura, K., & Kuriyama, H. (1988). The existence of a highly tetrodotoxin sensitive Na channel in freshly dispersed smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *Pflugers Arch.* 411, 423-428.

Ortega, M. A. & de Artinano, A. A. (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol.Res.* 36, 339-351.

Ostedgaard, L. S., Baldursson, O., & Welsh, M. J. (2001). Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J.Biol.Chem.* 276, 7689-7692.

Ottolia, M. & Toro, L. (1994). Potentiation of large conductance KCa channels by niflumic, flufenamic, and mefenamic acids. *Biophys.J.* 67, 2272-2279.

Pacaud, P., Loirand, G., Baron, A., Mironneau, C., & Mironneau, J. (1991). Ca²⁺ channel activation and membrane depolarization mediated by Cl⁻ channels in response to noradrenaline in vascular myocytes. *Br.J.Pharmacol.* 104, 1000-1006.

Pacaud, P., Loirand, G., Gregoire, G., Mironneau, C., & Mironneau, J. (1992). Calcium-dependence of the calcium-activated chloride current in smooth muscle cells of rat portal vein. *Pflugers Arch.* 421, 125-130.

Pacaud, P., Loirand, G., Lavie, J. L., Mironneau, C., & Mironneau, J. (1989). Calcium-activated chloride current in rat vascular smooth muscle cells in short-term primary culture. *Pflugers Arch.* 413, 629-636.

Pallone, T. L. & Huang, J. M. (2002). Control of descending vasa recta pericyte membrane potential by angiotensin II. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 282, F1064-F1074.

Park, K. S., Kim, T. K., & Kim, D. H. (1999). Cyclosporin A treatment alters characteristics of Ca^{2+} -release channel in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am.J Physiol* 276, H865-H872.

Park, M. K., Lomax, R. B., Tepikin, A. V., & Petersen, O. H. (2001). Local uncaging of caged Ca^{2+} reveals distribution of Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels in pancreatic acinar cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 10948-10953.

Pauli, B. U., Abdel-Ghany, M., Cheng, H. C., Gruber, A. D., Archibald, H. A., & Elble, R. C. (2000). Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 27, 901-905.

Pauli, B. U., Cheng, H. C., & Abdel-Ghany, M. (2002). CLCA adhesion in site-specific cancer metastasis. In *Calcium-activated chloride channels (Current topics in membranes, volume 53)*, ed. Fuller, C. M., pp. 415-430. Academic Press.

Paulmichl, M., Li, Y., Wickman, K., Ackerman, M., Peralta, E., & Clapham, D. (1992). New mammalian chloride channel identified by expression cloning. *Nature* 356, 238-241.

Pedersen, S. F., Prenen, J., Droogmans, G., Hoffmann, E. K., & Nilius, B. (1998). Separate swelling- and Ca^{2+} -activated anion currents in Ehrlich ascites tumor cells. *J.Membr.Biol.* 163, 97-110.

Perrino, B. A. (1999). Regulation of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain. *Arch.Biochem.Biophys.* 372, 159-165.

Perrino, B. A. & Soderling, T. R. (1998). Biochemistry and pharmacology of calmodulin-regulated phosphatase calcineurin. In *Calmodulin and signal transduction*, eds. Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M., pp. 170-236. Academic Press, New York.

Perrino, B. A., Wilson, A. J., Ellison, P., & Clapp, L. H. (2002). Substrate selectivity and sensitivity to inhibition by FK506 and cyclosporin A of calcineurin heterodimers composed of the alpha or beta catalytic subunit. *Eur.J Biochem.* 269, 3540-3548.

Persechini, A. & Stemmer, P. M. (2002). Calmodulin is a limiting factor in the cell. *Trends Cardiovasc.Med.* 12, 32-37.

Pilewski, J. M. & Frizzell, R. A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev.* 79, S215-S255.

Piper, A. S. & Greenwood, I. A. (2003). Anomalous effect of anthracene-9-carboxylic acid on calcium-activated chloride currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 138, 31-38.

Piper, A. S., Greenwood, I. A., & Large, W. A. (2002). Dual effect of blocking agents on Ca^{2+} -activated Cl^{-} currents in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Physiol* 539, 119-131.

Piper, A. S. & Large, W. A. (2003). Multiple conductance states of single Ca^{2+} -activated Cl^{-} channels in rabbit pulmonary artery smooth muscle cells. *J.Physiol* 547, 181-196.

Pitt, G. S., Zuhlke, R. D., Hudmon, A., Schulman, H., Reuter, H., & Tsien, R. W. (2001). Molecular basis of calmodulin tethering and Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type Ca^{2+} channels. *J Biol.Chem.* 276, 30794-30802.

Piwon, N., Gunther, W., Schwake, M., Bosl, M. R., & Jentsch, T. J. (2000). ClC-5 Cl^{-} -channel disruption impairs endocytosis in a mouse model for Dent's disease. *Nature* 408, 369-373.

Polasek, M., Pospisilova, M., & Urbanek, M. (2000). Capillary isotachophoretic determination of flufenamic, mefenamic, niflumic and tolfenamic acid in pharmaceuticals. *J Pharm.Biomed.Anal.* 23, 135-142.

Pollock, N. S., Kargacin, M. E., & Kargacin, G. J. (1998). Chloride channel blockers inhibit Ca^{2+} uptake by the smooth muscle sarcoplasmic reticulum. *Biophys.J.* 75, 1759-1766.

Pusch, M. (1996). Knocking on channel's door. The permeating chloride ion acts as the gating charge in ClC-0 . *J.Gen.Physiol* 108, 233-236.

Pusch, M., Jordt, S. E., Stein, V., & Jentsch, T. J. (1999). Chloride dependence of hyperpolarization-activated chloride channel gates. *J.Physiol* 515 (Pt 2), 341-353.

Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A., & Jentsch, T. J. (1995). Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* 373, 527-531.

Qu, Z. & Hartzell, H. C. (2000). Anion permeation in Ca(2+)-activated Cl(-) channels. *J.Gen.Physiol* 116, 825-844.

Qu, Z. & Hartzell, H. C. (2001). Functional geometry of the permeation pathway of Ca2+-activated Cl-channels inferred from analysis of voltage-dependent block. *J.Biol.Chem.* 276, 18423-18429.

Qu, Z., Wei, R. W., Mann, W., & Hartzell, H. C. (2003). Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca(2+)-activated Cl(-) currents. *J.Biol.Chem.* 278, 49563-49572.

Quignard, J. F., Ryckwaert, F., Albat, B., Nargeot, J., & Richard, S. (1997). A novel tetrodotoxin-sensitive Na⁺ current in cultured human coronary myocytes. *Circ.Res.* 80, 377-382.

Quinton, P. M. (1999). Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 79, S3-S22.

Raghuram, V., Mak, D. D., & Foskett, J. K. (2001). Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98, 1300-1305.

Ran, S. & Benos, D. J. (1991). Isolation and functional reconstitution of a 38-kDa chloride channel protein from bovine tracheal membranes. *J.Biol.Chem.* 266, 4782-4788.

Ran, S. & Benos, D. J. (1992). Immunopurification and structural analysis of a putative epithelial Cl⁻ channel protein isolated from bovine trachea. *J.Biol.Chem.* 267, 3618-3625.

Rasola, A., Galletta, L. J., Gruenert, D. C., & Romeo, G. (1994). Volume-sensitive chloride currents in four epithelial cell lines are not directly correlated to the expression of the MDR-1 gene. *J.Biol.Chem.* 269, 1432-1436.

Remillard, C. V. & Leblanc, N. (1996). Mechanism of inhibition of delayed rectifier K⁺ current by 4-aminopyridine in rabbit coronary myocytes. *J.Physiol* 491 (Pt 2), 383-400.

Remillard, C. V., Lupien, M. A., Crepeau, V., & Leblanc, N. (2000). Role of Ca²⁺- and swelling-activated Cl⁻ channels in α 1-adrenoceptor-mediated tone in pressurized rabbit mesenteric arterioles. *Cardiovasc.Res.* 46, 557-568.

Rich, R. C. & Schulman, H. (1998). Substrate-directed function of calmodulin in autophosphorylation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol.Chem.* 273, 28424-28429.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., & . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.

Roeper, J., Lorra, C., & Pongs, O. (1997). Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel KV1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *J Neurosci.* 17, 3379-3391.

Rokolya, A. & Singer, H. A. (2000). Inhibition of CaM kinase II activation and force maintenance by KN-93 in arterial smooth muscle. *Am.J Physiol Cell Physiol* 278, C537-C545.

Roman, R. M., Smith, R. L., Feranchak, A. P., Clayton, G. H., Doctor, R. B., & Fitz, J. G. (2001). ClC-2 chloride channels contribute to HTC cell volume homeostasis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280, G344-G353.

Romio, L., Musante, L., Cinti, R., Seri, M., Moran, O., Zegarra-Moran, O., & Galletta, L. J. (1999). Characterization of a murine gene homologous to the bovine CaCC chloride channel. *Gene* 228, 181-188.

Rongo, C. (2002). A fresh look at the role of CaMKII in hippocampal synaptic plasticity and memory. *Bioessays* 24, 223-233.

Rosenbohm, A., Rudel, R., & Fahlke, C. (1999). Regulation of the human skeletal muscle chloride channel hClC-1 by protein kinase C. *J.Physiol* 514 (Pt 3), 677-685.

Rousseau, E., Michaud, C., Lefebvre, D., Proteau, S., & Decrouy, A. (1996). Reconstitution of ionic channels from inner and outer membranes of mammalian cardiac nuclei. *Biophys.J.* 70, 703-714.

Rugarli, E. I., Adler, D. A., Borsani, G., Tsuchiya, K., Franco, B., Hauge, X., Disteché, C., Chapman, V., & Ballabio, A. (1995). Different chromosomal localization of the *Clcn4* gene in *Mus spretus* and C57BL/6J mice. *Nat.Genet.* 10, 466-471.

Rusnak, F. & Mertz, P. (2000). Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 80, 1483-1521.

Sakai, H., Ukai, M., Ikari, A., Asano, S., & Ikeguchi, N. (2001). Is rabbit CLCA1 related to the basolateral Ca^{2+} -dependent Cl^{-} channel of gastric parietal cells? *Jpn.J.Physiol* 51, 121-125.

Salter, K. J. & Kozlowski, R. Z. (1998). Differential electrophysiological actions of endothelin-1 on Cl^{-} and K^{+} currents in myocytes isolated from aorta, basilar and pulmonary artery. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 284, 1122-1131.

Saviane, C., Conti, F., & Pusch, M. (1999). The muscle chloride channel ClC-1 has a double-barreled appearance that is differentially affected in dominant and recessive myotonia. *J.Gen.Physiol* 113, 457-468.

Scarparo, H. C., Santos, G. C., Leal-Cardoso, J. H., & Criddle, D. N. (2000). Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT-induced contraction of the rat isolated stomach fundus. *Br.J.Pharmacol.* 130, 678-684.

Schmidt-Rose, T. & Jentsch, T. J. (1997). Transmembrane topology of a CLC chloride channel. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 7633-7638.

Schuh, K., Quaschnig, T., Knauer, S., Hu, K., Kocak, S., Roethlein, N., & Neyses, L. (2003). Regulation of vascular tone in animals overexpressing the sarcolemmal calcium pump. *J Biol.Chem.* 278, 41246-41252.

Schuhmann, K., Romanin, C., Baumgartner, W., & Groschner, K. (1997). Intracellular Ca^{2+} inhibits smooth muscle L-type Ca^{2+} channels by activation of protein phosphatase type 2B and by direct interaction with the channel. *J Gen. Physiol* 110, 503-513.

Schulman, H. (1993). The multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 247-253.

Schulman, H. & Hanson, P. I. (1993). Multifunctional Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase. *Neurochem. Res.* 18, 65-77.

Schulman, H., Hanson, P. I., & Meyer, T. (1992). Decoding calcium signals by multifunctional CaM kinase. *Cell Calcium* 13, 401-411.

Schultz, B. D., Singh, A. K., Devor, D. C., & Bridges, R. J. (1999). Pharmacology of CFTR chloride channel activity. *Physiol Rev.* 79, S109-S144.

Schumacher, M. A., Rivard, A. F., Bachinger, H. P., & Adelman, J. P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca^{2+} -activated K^{+} channel complexed with Ca^{2+} /calmodulin. *Nature* 410, 1120-1124.

Schwartz, R. S., Rybicki, A. C., & Nagel, R. L. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride channel-associated protein pICln in human young red blood cells: association with actin. *Biochem. J.* 327 (Pt 2), 609-616.

Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M. E., Stutts, M. J., & Guggino, W. B. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev.* 79, S145-S166.

Scott-Ward, T. S., Li, S., Schmidt, A., Cai, Z., & Sheppard, D. N. (2004). Direct block of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^{-} channel by niflumic acid. *Mol. Membr. Biol.* 21, 27-38.

Sergeant, G. P., Hollywood, M. A., McHale, N. G., & Thornbury, K. D. (2001). Spontaneous Ca^{2+} activated Cl^{-} currents in isolated urethral smooth muscle cells. *J. Urol.* 166, 1161-1166.

Shen, K. & Meyer, T. (1999). Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. *Science* 284, 162-166.

Sheppard, D. N. & Welsh, M. J. (1999). Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev.* 79, S23-S45.

Shiang, R., Ryan, S. G., Zhu, Y. Z., Hahn, A. F., O'Connell, P., & Wasmuth, J. J. (1993). Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nat. Genet.* 5, 351-358.

Simon, D. B., Bindra, R. S., Mansfield, T. A., Nelson-Williams, C., Mendonca, E., Stone, R., Schurman, S., Nayir, A., Alpay, H., Bakkaloglu, A., Rodriguez-Soriano, J., Morales, J. M., Sanjad, S. A., Taylor, C. M., Pilz, D., Brem, A., Trachtman, H., Griswold, W., Richard, G. A., John, E., & Lifton, R. P. (1997). Mutations in the chloride channel gene, CLCNKB, cause Bartter's syndrome type III. *Nat. Genet.* 17, 171-178.

Singer, H. A., Abraham, S. T., & Schworer, C. M. (1996). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. In *Biochemistry of smooth muscle contraction*, ed. Barany, M., pp. 143-154. Academic Press.

Sinkkonen, S. T., Mansikkamaki, S., Moykkynen, T., Luddens, H., Uusi-Oukari, M., & Korpi, E. R. (2003). Receptor subtype-dependent positive and negative modulation of GABA(A) receptor function by niflumic acid, a nonsteroidal anti-inflammatory drug. *Mol. Pharmacol.* 64, 753-763.

Soderling, T. R. & Stull, J. T. (2001). Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *Chem. Rev.* 101, 2341-2352.

Somlyo, A. V., Gonzalez-Serratos, H. G., Shuman, H., McClellan, G., & Somlyo, A. P. (1981). Calcium release and ionic changes in the sarcoplasmic reticulum of tetanized muscle: an electron-probe study. *J. Cell Biol.* 90, 577-594.

Staley, K., Smith, R., Schaack, J., Wilcox, C., & Jentsch, T. J. (1996). Alteration of GABAA receptor function following gene transfer of the CLC-2 chloride channel. *Neuron* 17, 543-551.

Steinmeyer, K., Klocke, R., Ortland, C., Gronemeier, M., Jockusch, H., Grunder, S., & Jentsch, T. J. (1991). Inactivation of muscle chloride channel by transposon insertion in myotonic mice. *Nature* 354, 304-308.

Stobrawa, S. M., Breiderhoff, T., Takamori, S., Engel, D., Schweizer, M., Zdebik, A. A., Bosl, M. R., Ruether, K., Jahn, H., Draguhn, A., Jahn, R., & Jentsch, T. J. (2001). Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus. *Neuron* 29, 185-196.

Stohr, H., Marquardt, A., Nanda, I., Schmid, M., & Weber, B. H. (2002). Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *Eur.J.Hum.Genet.* 10, 281-284.

Strack, S., Barban, M. A., Wadzinski, B. E., & Colbran, R. J. (1997a). Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. *J.Neurochem.* 68, 2119-2128.

Strack, S., Westphal, R. S., Colbran, R. J., Ebner, F. F., & Wadzinski, B. E. (1997b). Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associate with and dephosphorylate neurofilaments. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 49, 15-28.

Strange, K., Emma, F., & Jackson, P. S. (1996). Cellular and molecular physiology of volume-sensitive anion channels. *Am.J.Physiol* 270, C711-C730.

Strehler, E. E. & Treiman, M. (2004). Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr.Mol.Med.* 4, 323-335.

Stricker, S. A. & Whitaker, M. (1999). Confocal laser scanning microscopy of calcium dynamics in living cells. *Microsc.Res.Tech.* 46, 356-369.

Strobaek, D., Christophersen, P., Dissing, S., & Olesen, S. P. (1996). ATP activates K and Cl channels via purinoceptor-mediated release of Ca²⁺ in human coronary artery smooth muscle. *Am.J.Physiol* 271, C1463-C1471.

Stull, J. T., Krueger, J., Kann, K. E., Gao, Z. H., Zhi, G., & Padre, R. (1996). Myosine light chain kinase. In *Biochemistry of smooth muscle contraction*, ed. Barany, M., pp. 119-130. Academic Press.

Stutts, M. J., Canessa, C. M., Olsen, J. C., Hamrick, M., Cohn, J. A., Rossier, B. C., & Boucher, R. C. (1995). CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. *Science* 269, 847-850.

Sugiura, R., Sio, S. O., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2001). Molecular genetic analysis of the calcineurin signaling pathways. *Cell Mol.Life Sci.* 58, 278-288.

Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K. W., & Nathans, J. (2002). The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 4008-4013.

Sun, X. P., Supplisson, S., & Mayer, E. (1993). Chloride channels in myocytes from rabbit colon are regulated by a pertussis toxin-sensitive G protein. *Am.J.Physiol* 264, G774-G785.

Sussman, M. A., Lim, H. W., Gude, N., Taigen, T., Olson, E. N., Robbins, J., Colbert, M. C., Gualberto, A., Wicczorek, D. F., & Molkentin, J. D. (1998). Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science* 281, 1690-1693.

Szabo, I., Lepple-Wienhues, A., Kaba, K. N., Zoratti, M., Gulbins, E., & Lang, F. (1998). Tyrosine kinase-dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 6169-6174.

Tanifuji, M., Sokabe, M., & Kasai, M. (1987). An anion channel of sarcoplasmic reticulum incorporated into planar lipid bilayers: single-channel behavior and conductance properties. *J.Membr.Biol.* 99, 103-111.

Tao, G. Z., Komatsuda, A., Miura, A. B., Kobayashi, A., Itoh, H., & Tashima, Y. (1998). pICln predominantly localizes at luminal surface membranes of distal tubules and Henle's ascending limbs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 247, 668-673.

Tarran, R., Loewen, M. E., Paradiso, A. M., Olsen, J. C., Gray, M. A., Argent, B. E., Boucher, R. C., & Gabriel, S. E. (2002). Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca²⁺-activated Cl⁻ conductances. *J.Gen.Physiol* 120, 407-418.

Teo, T. S. & Wang, J. H. (1973). Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca^{2+} binding protein. *J Biol.Chem.* 248, 5950-5955.

Teo, T. S., Wang, T. H., & Wang, J. H. (1973). Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. *J Biol.Chem.* 248, 588-595.

TIPS Supplement (2001). 2001 Receptor and ion channel nomenclature supplement (12th edition). *Trends Pharmacol.Sci.Suppl*:1-84., 1-145.

Tokumitsu, H., Chijiwa, T., Hagiwara, M., Mizutani, A., Terasawa, M., & Hidaka, H. (1990). KN-62, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-methyl-L-tyrosyl]-4-phenylpiperazine, a specific inhibitor of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J.Biol.Chem.* 265, 4315-4320.

Toland, H. M., McCloskey, K. D., Thornbury, K. D., McHale, N. G., & Hollywood, M. A. (2000). Ca^{2+} -activated Cl^{-} current in sheep lymphatic smooth muscle. *Am.J Physiol Cell Physiol* 279, C1327-C1335.

Toma, C., Greenwood, I. A., Helliwell, R. M., & Large, W. A. (1996). Activation of potassium currents by inhibitors of calcium-activated chloride conductance in rabbit portal vein smooth muscle cells. *Br.J.Pharmacol.* 118, 513-520.

Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol.Rev.* 52, 639-672.

Tsunenari, T., Sun, H., Williams, J., Cahill, H., Smallwood, P., Yau, K. W., & Nathans, J. (2003). Structure-Function Analysis of the Bestrophin Family of Anion Channels. *Journal of Biological Chemistry* 278, 41114-41125.

Tulk, B. M., Schlesinger, P. H., Kapadia, S. A., & Edwards, J. C. (2000). CLIC-1 functions as a chloride channel when expressed and purified from bacteria. *J.Biol.Chem.* 275, 26986-26993.

Uchida, S. (2000). In vivo role of CLC chloride channels in the kidney. *Am.J.Physiol Renal Physiol* 279, F802-F808.

Uchida, S., Rai, T., Yatsushige, H., Matsumura, Y., Kawasaki, M., Sasaki, S., & Marumo, F. (1998). Isolation and characterization of kidney-specific ClC-K1 chloride channel gene promoter. *Am.J.Physiol* 274, F602-F610.

Ullrich, N. & Sontheimer, H. (1996). Biophysical and pharmacological characterization of chloride currents in human astrocytoma cells. *Am.J.Physiol* 270, C1511-C1521.

Urushidani, T., Chow, D., & Forte, J. G. (1999). Redistribution of a 120 kDa phosphoprotein in the parietal cell associated with stimulation. *J Membr.Biol.* 168, 209-220.

Valenzuela, S. M., Martin, D. K., Por, S. B., Robbins, J. M., Warton, K., Bootcov, M. R., Schofield, P. R., Campbell, T. J., & Breit, S. N. (1997). Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J.Biol.Chem.* 272, 12575-12582.

Valverde, M. A., Diaz, M., Sepulveda, F. V., Gill, D. R., Hyde, S. C., & Higgins, C. F. (1992). Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein. *Nature* 355, 830-833.

Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M. (1998). Calmodulin and calcium signal transduction: an introduction. In *Calmodulin and signal transduction*, eds. Van Eldik, L. J. & Watterson, D. M., pp. 1-16. Academic Press, New York.

Van Renterghem, C. & Lazdunski, M. (1993). Endothelin and vasopressin activate low conductance chloride channels in aortic smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 425, 156-163.

Vanoye, C. G., Altenberg, G. A., & Reuss, L. (1997). P-glycoprotein is not a swelling-activated Cl⁻ channel; possible role as a Cl⁻ channel regulator. *J.Physiol* 502 (Pt 2), 249-258.

Voets, T., Droogmans, G., Raskin, G., Eggermont, J., & Nilius, B. (1999). Reduced intracellular ionic strength as the initial trigger for activation of endothelial volume-regulated anion channels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 5298-5303.

Voets, T., Wei, L., De Smet, P., Van Driessche, W., Eggermont, J., Droogmans, G., & Nilius, B. (1997). Downregulation of volume-activated Cl⁻ currents during muscle differentiation. *Am.J Physiol* 272, C667-C674.

Waldegger, S. & Jentsch, T. J. (2000a). From tonus to tonicity: physiology of CLC chloride channels. *J.Am.Soc.Nephrol.* 11, 1331-1339.

Waldegger, S. & Jentsch, T. J. (2000b). Functional and structural analysis of CLC-K chloride channels involved in renal disease. *J.Biol.Chem.* 275, 24527-24533.

Walsh, M. P. (1994). Calmodulin and the regulation of smooth muscle contraction. *Mol.Cell Biochem.* 135, 21-41.

Wang, G. X., Hatton, W. J., Wang, G. L., Zhong, J., Yamboliev, I., Duan, D., & Hume, J. R. (2003). Functional effects of novel anti-CLC-3 antibodies on native volume-sensitive osmolyte and anion channels in cardiac and smooth muscle cells. *Am.J Physiol Heart Circ.Physiol* 285, H1453-H1463.

Wang, H. S., Dixon, J. E., & McKinnon, D. (1997a). Unexpected and differential effects of Cl⁻ channel blockers on the Kv4.3 and Kv4.2 K⁺ channels. Implications for the study of the I(to2) current. *Circ.Res.* 81, 711-718.

Wang, S. S., Devuyst, O., Courtoy, P. J., Wang, X. T., Wang, H., Wang, Y., Thakker, R. V., Guggino, S., & Guggino, W. B. (2000). Mice lacking renal chloride channel, CLC-5, are a model for Dent's disease, a nephrolithiasis disorder associated with defective receptor-mediated endocytosis. *Hum.Mol.Genet.* 9, 2937-2945.

Wang, Y. X., Fleischmann, B. K., & Kotlikoff, M. I. (1997b). M2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and Gi/G(o) requirements. *Am.J.Physiol* 273, C500-C508.

Wang, Y. X. & Kotlikoff, M. I. (1997a). Inactivation of calcium-activated chloride channels in smooth muscle by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 14918-14923.

Wang, Y. X. & Kotlikoff, M. I. (1997b). Muscarinic signaling pathway for calcium release and calcium-activated chloride current in smooth muscle. *Am.J.Physiol* 273, C509-C519.

Warton, K., Tonini, R., Fairlie, W. D., Matthews, J. M., Valenzuela, S. M., Qiu, M. R., Wu, W. M., Pankhurst, S., Bauskin, A. R., Harrop, S. J., Campbell, T. J., Curmi, P. M., Breit, S. N., & Mazzanti, M. (2002). Recombinant CLIC1 (NCC27) assembles in lipid bilayers via a pH-dependent two-state process to form chloride ion channels with identical characteristics to those observed in Chinese hamster ovary cells expressing CLIC1. *J.Biol.Chem.* 277, 26003-26011.

Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Cassiman, J. J., Droogmans, G., & Nilius, B. (2001). The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca^{2+} -activated Cl^- channels. *Pflugers Arch.* 442, 280-285.

Wei, L., Vankeerberghen, A., Cuppens, H., Eggermont, J., Cassiman, J. J., Droogmans, G., & Nilius, B. (1999). Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Pflugers Arch.* 438, 635-641.

Weinreich, F. & Jentsch, T. J. (2001). Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels. *J.Biol.Chem.* 276, 2347-2353.

White, K., Marquardt, A., & Weber, B. H. (2000). VMD2 mutations in vitelliform macular dystrophy (Best disease) and other maculopathies. *Hum.Mutat.* 15, 301-308.

White, M. M. & Aylwin, M. (1990). Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca^{2+} -activated Cl^- channels in *Xenopus* oocytes. *Mol.Pharmacol.* 37, 720-724.

Wilson, A. J., Jabr, R. I., & Clapp, L. H. (2000). Calcium modulation of vascular smooth muscle ATP-sensitive K^{+} channels: role of protein phosphatase-2B. *Circ.Res.* 87, 1019-1025.

Winpenny, J. P., Harris, A., Hollingsworth, M. A., Argent, B. E., & Gray, M. A. (1998). Calcium-activated chloride conductance in a pancreatic adenocarcinoma cell line of ductal origin (HPAF) and in freshly isolated human pancreatic duct cells. *Pflugers Arch.* 435, 796-803.

Wu, G. & Hamill, O. P. (1992). NPPB block of Ca^{++} -activated Cl^- currents in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch.* 420, 227-229.

Wu, S. N., Jan, C. R., & Chiang, H. T. (2001a). Fenamates stimulate BKCa channel osteoblast-like MG-63 cells activity in the human. *J Investig.Med.* 49, 522-533.

Wu, Y., Dzhura, I., Colbran, R. J., & Anderson, M. E. (2001b). Calmodulin kinase and a calmodulin-binding 'IQ' domain facilitate L-type Ca²⁺ current in rabbit ventricular myocytes by a common mechanism. *J.Physiol* 535, 679-687.

Xia, X. M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J. E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C. T., Lutsenko, S., Maylie, J., & Adelman, J. P. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 395, 503-507.

Xiong, H., Li, C., Garami, E., Wang, Y., Ramjeesingh, M., Galley, K., & Bear, C. E. (1999). ClC-2 activation modulates regulatory volume decrease. *J.Membr.Biol.* 167, 215-221.

Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T., & Sperelakis, N. (1998). ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am.J.Physiol* 274, C25-C37.

Yuan, W. & Bers, D. M. (1994). Ca-dependent facilitation of cardiac Ca current is due to Ca-calmodulin-dependent protein kinase. *Am.J.Physiol* 267, H982-H993.

Yuan, X. J. (1997). Role of calcium-activated chloride current in regulating pulmonary vasomotor tone. *Am.J.Physiol* 272, L959-L968.

Zhang, J. J. & Jacob, T. J. (1997). Three different Cl⁻ channels in the bovine ciliary epithelium activated by hypotonic stress. *J.Physiol* 499 (Pt 2), 379-389.

Zhang, Y., Vogalis, F., & Goyal, R. K. (1998). Nitric oxide suppresses a Ca(2+)-stimulated Cl⁻ current in smooth muscle cells of opossum esophagus. *Am.J.Physiol* 274, G886-G890.

Zhang, Z., Huang, J. M., Turner, M. R., Rhinehart, K. L., & Pallone, T. L. (2001). Role of chloride in constriction of descending vasa recta by angiotensin II. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 280, R1878-R1886.

Zhang, Z. R., McDonough, S. I., & McCarty, N. A. (2000). Interaction between permeation and gating in a putative pore domain mutant in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Biophys.J.* 79, 298-313.

Zhou, Y., Dong, Q., Louahed, J., Dragwa, C., Savio, D., Huang, M., Weiss, C., Tomer, Y., McLane, M. P., Nicolaidis, N. C., & Levitt, R. C. (2001). Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma. *Am.J Respir.Cell Mol.Biol.* 25, 486-491.

Zhou, Z. L. & Ikebe, M. (1994). New isoforms of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II in smooth muscle. *Biochem.J* 299 (Pt 2), 489-495.

Zhu, W., Zou, Y., Shiojima, I., Kudoh, S., Aikawa, R., Hayashi, D., Mizukami, M., Toko, H., Shibasaki, F., Yazaki, Y., Nagai, R., & Komuro, I. (2000). Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 275, 15239-15245.

Zhu, Y. & Yakel, J. L. (1997). Calcineurin modulates G protein-mediated inhibition of N-type calcium channels in rat sympathetic neurons. *J Neurophysiol.* 78, 1161-1165.

Zhuo, M., Zhang, W., Son, H., Mansuy, I., Sobel, R. A., Seidman, J., & Kandel, E. R. (1999). A selective role of calcineurin α in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96, 4650-4655.

Appendices

Appendice I : Solutionsxxiii

*Appendice II : Paramètres utilisés pour simuler par
ordinateur le modèle cinétique décrivant
l'inhibition et la stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ par
l'acide niflumique*xxiv

APPENDICE I

Composition des solutions de pipette pour l'électrophysiologie (mM)

Produits	I [§]	II	III	IV
CsAsp	—	—	100	100
CsCl	126	106	20	20
TEA	—	20	20	20
HEPES	10	5	5	5
Glucose	20	—	—	—
BAPTA	—	10	10	—
EGTA	—	—	—	10
MgATP	—	3	5	5
GTP diNa	—	0.2	0.2	0.2
MgCl ₂	—	*	*	*
CaCl ₂	—	**	**	**
pH [†]	7.2	7.2	7.2	7.2

§ Contient également l'un ou l'autre de ces ionophores antibactériens (300 µg/ml) : Amphotéricine B ou Nystatine.

† Ajusté avec CsOH en solution.

* Les quantités ajoutées de MgCl₂ ont été calculées avec le logiciel EQCAL Buffer ou WinMaxC pour obtenir une concentration de Mg²⁺ libre de 1 mM.

** Les quantités de CaCl₂ ajouté furent calculées avec le logiciel EQCAL Buffer ou WinMaxC pour obtenir une concentration de Ca²⁺ libre entre 250 nM et 1 µM.

Composition des solutions externes pour l'électrophysiologie (mM)

Produits	A	B	C	D
NaCl	126	126	130	130
NaHCO ₃	—	—	10	10
TEA	—	10	5.4	5.4
4-aminopyridine	—	5	—	—
HEPES	10	10	10	10
Glucose	20	20	5.5	5.5
MgCl ₂	1.2	1.2	0.5	0.5
CaCl ₂	1.8	1.8	1.8	1.8
Nifedipine	—	—	—	0.001
pH*	7.2	7.4	7.35	7.35

* Ajusté avec NaOH en solution.

APPENDICE II

**Paramètres utilisés pour simuler par ordinateur le modèle cinétique décrivant
l'inhibition et la stimulation de $I_{Cl(Ca)}$ par l'acide niflumique**

	Unités
Perméabilité et sélectivité	
$P_{Cl(Ca)} max = 0.01$	$\mu m ms^{-1}$
$E_{Cl} = -30$	mV
Valeurs de « gating » variables	
$C = 0.6$	
$O_1 = 0.7$	
$B_1 = 0$	
$B_2 = 0$	
$O_1 = 1$	
$O_2 = 1$	
Activation et désactivation	
$\alpha_1 (V) = 0.0075 / \{1 + \exp [-0.1 * (V - 50)]\}$	ms^{-1}
$\beta_1 (V) = 0.1 / \{1 + \exp [0.1 * (V + 80)]\}$	ms^{-1}
Liaison de haute affinité de l'ANF et séparation	
$\alpha_2 ([ANF]) = [ANF]^2 / \{[ANF]^2 + 0.023^2\}$	ms^{-1}
$\beta_2 = 0.5$	ms^{-1}
$\alpha_3 = 0.058$	ms^{-1}
$\beta_3 ([ANF]) = 0.05 * \{[ANF] / \{[ANF] + 0.01\}$	ms^{-1}
Liaison de faible affinité de l'ANF et séparation	
$\alpha_4 ([ANF]) = 0.00325 * \{[ANF] / \{[ANF] + 1.25\}$	ms^{-1}
$\alpha_5 = 0.0004$	ms^{-1}
Récupération de haute affinité et liaison rapide de l'ANF	
$\alpha_6 = 0.0006$	ms^{-1}
Récupération de faible affinité et liaison rapide de l'ANF	
$\alpha_7 = 0.0001$	ms^{-1}